

BS

Method for the fermentative production of D-pantothenic acid using coryneform bacteria

Publication number: EP1006189

Publication date: 2000-06-07

Inventor: EGGELING LOTHAR DR (DE); THIERBACH GEORG DR (DE); SAHM HERRMANN PROF DR (DE)

Applicant: DEGUSSA (DE); KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH (DE)

Classification:

- International: A23L1/302; A61K31/197; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/09; C12N15/52; C12N15/60; C12P13/02; C12R1/15; A23L1/302; A61K31/185; C12N1/21; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/09; C12N15/52; C12N15/60; C12P13/00; (IPC1-7): C12N1/21; C12N15/52; C12N9/00; C12N9/10; C12N9/88; C12N15/54; C12N15/60; C12N15/77; C12P13/02; C12R1/15; C12R1/15; C12R1/19

- European: C12N9/00L; C12N9/10A2; C12N9/88; C12N15/52; C12P13/02

Application number: EP19990123738 19991130

Priority number(s): DE19981055312 19981201

Also published as:

US6177264 (B1)
ZA9907407 (A)
JP2000166580 (A)
EP1006189 (A3)
DE19855312 (A1)

Cited documents:

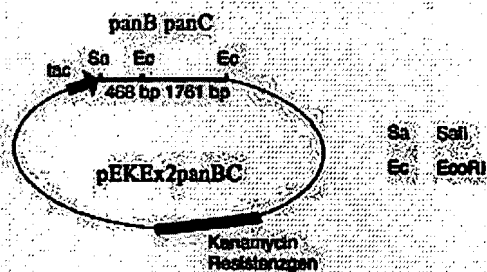
EP0590857
US5518906
EP1006192
WO0100843
WO0050624
more >>

Report a data error here

Abstract of EP1006189

Recombinant *Corynebacterium* DNA (I), present in microorganisms of the *Corynebacterium* genus and comprising at least one of the panB, panC and/or ilvD genes, is new. Recombinant *Corynebacterium* DNA (I), present in microorganisms of the *Corynebacterium* genus and comprising at least one of the (i) panB (ketopantohydroxymethyltransferase), (ii) panC (pantothenic acid synthetase), especially the panBC operon, and/or (iii) ilvD (dihydroxyacid dehydratase) genes, and comprising the fully defined 2164, 2164 and/or 2952 base pair sequences, respectively, is new. Independent claims are also included for the following: (1) microorganisms (II), especially *Corynebacterium*, transformed with one or more of (I); (2) shuttle vector pECM3ilvBNCD (III), deposited as *E. coli* DH5 alpha mcr/pECM3ilvBNCD under DSM 12457; (3) shuttle vector pEKEx2panBC (IV), deposited as *E. coli* DH5 alpha mcr/pEKEx3panBC under DSM 12456; and (4) a method (V) for the preparation of pantothenic acid.

Abbildung 2



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



(12) **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

(43) Veröffentlichungstag:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 15/52, C12N 15/54,
C12N 15/60, C12N 15/77,
C12P 13/02
// C12N1/21, (C12R1/15, 1:19)**

(21) Anmeldenummer: **99123738.9**

(22) Anmeldetag: **30.11.1999**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE**
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

• **FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH GMBH**
52425 Jülich (DE)

(30) Priorität: **01.12.1998 DE 19855312**

(72) Erfinder:
• **Eggeling, Lothar, Dr.**
52428 Jülich (DE)
• **Thierbach, Georg, Dr.**
33613 Bielefeld (DE)
• **Sahm, Herrmann, Prof.Dr.**
52428 Jülich (DE)

(71) Anmelder:
• **Degussa-Hüls Aktiengesellschaft**
60287 Frankfurt am Main (DE)

(54) **Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien**

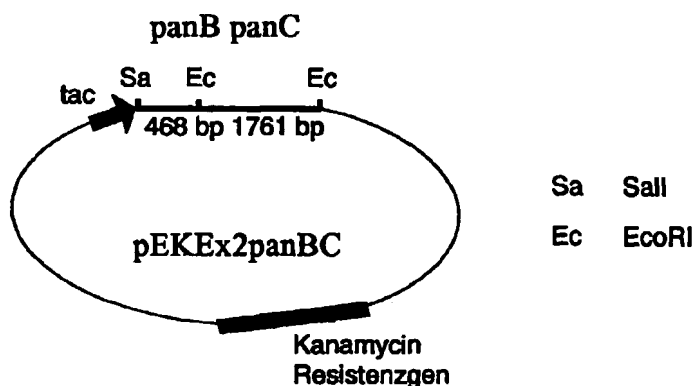
(57) Die Erfindung betrifft in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

thetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

- a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
- b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsyn-

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*, in denen die genannten Gene verstärkt werden.

Abbildung 2



Beschreibung**Stand der Technik**

- 5 **[0001]** Die Pantothersäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.
- [0002]** Pantothersäure kann durch chemische Synthese oder biotechnologisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährlösungen hergestellt werden. Der Vorteil der biotechnologischen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der Bildung der gewünschten stereo-isomeren D-Form der Pantothersäure.
- 10 **[0003]** Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaryomyces castellii* können, wie in EP-A 0 493 060 gezeigt, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantothersäure produzieren. EP-A 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantothersäure-Biosynthesegenen mittels der Plasmide pFV3 und pFV5 die Bildung von D-Pantothersäure verbessert wird.
- 15 **[0004]** EP-A 0 590 857 betrifft Stämme von *Escherichia coli*, die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite, wie z. B. Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure etc. tragen und in einer Nährlösung, die Glucose und β -Alanin enthält, D-Pantoinsäure und D-Pantothersäure produzieren. In EP- 0 590 857 wird weiterhin beschrieben, daß durch Amplifikation von nicht näher definierten Pantothersäure-Biosynthesegenen aus *E.coli*, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, die Produktion von D-Pantoinsäure und D-Pantothersäure in *E.coli* verbessert werden kann.
- 20 **[0005]** In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantothersäure bildenden Mutanten von *Escherichia coli* durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die Pantothersäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.

Aufgabe der Erfindung

- 25 **[0006]** Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt neue Grundlagen für verbesserte Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothersäure mit Hilfe coryneformer Bakterien bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

- 30 **[0007]** Das Vitamin Pantothersäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran verbesserte Verfahren zur Herstellung von Pantothersäure bereitzustellen.
- Wenn im folgenden Text D-Pantothersäure oder Pantothersäure oder Pantothenat erwähnt werden, sind damit nicht
- 35 nur die freie Säure, sondern auch die Salze der D-Pantothersäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.
- Gegenstand der Erfindung sind in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

- 40 a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
 b) codierend für das panC-Gen (Pantothenatsynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls
 c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.

- 45 **[0008]** Gegenstand der Erfindung sind ebenso replizierbare DNA gemäß dem genannten Anspruch 1 mit:

- 50 (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,
 (ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder
 (iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls
 (iiii) funktionsneutrale Sinnmutationen in (i).

- 55 **[0009]** Ebenso werden beansprucht coryneforme Mikroorganismen, insbesondere der Gattung *Corynebacterium*, transformiert durch die Einführung einer oder mehrer replizierbarer DNA-Stücke.
- Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung von D-Pantothersäure unter Verwendung, insbesond-

ere diese Säure bereits produzierender coryneformer Bakterien, in denen die Gene panB und panC einzeln oder kombiniert miteinander gegebenenfalls kombiniert mit einer Defektmutation im ilvA-Gen oder einer Verstärkung der Gene ilvBN, ilvC oder ilvD verstärkt, insbesondere überexprimiert werden.

[0010] Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme in einem Mikroorganismus, die durch die entsprechende DNA kodiert werden, indem man z. B. die Kopienzahl des(der) Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen Aktivität kodiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

[0011] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantothenensäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen, insbesondere aus Glucose oder Saccharose. Es handelt sich um coryneforme Bakterien z. B. der Gattungen *Corynebacterium* oder *Arthrobacter*. Bei der Gattung *Corynebacterium* ist insbesondere die Art *Corynebacterium glutamicum* zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt, ist Aminosäuren zu bilden. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 und davon abgeleitete Stämme.

[0012] Die Erfinder fanden heraus, dass nach Verstärkung, insbesondere Überexpression, der neu isolierten D-Pantothenatbiosynthesegene panB und panC einzeln oder gemeinsam (panBC-Operon) aus *Corynebacterium glutamicum*, die für die Enzyme Ketopantoathydroxymethyltransferase und Pantothenatesynthetase kodieren, in verbesserter Weise D-Pantothenat produziert wird.

[0013] Die Erfinder haben weiter festgestellt, daß eine verstärkte Expression des neuen Valinbiosynthesegens ilvD aus *Corynebacterium glutamicum*, welches für das Enzym Dihydroxysäuredehydratase kodiert, zur erhöhten D-Pantothenatbildung beiträgt. Erfindungsgemäss bewirken neben diesem Gen auch die verstärkte Expression der ilvBN-Gene, die für das Enzym Acetohydroxysäuresynthase kodieren, und des ilvC-Gens, das für das Enzym Isomeroereduktase kodiert, in *Corynebacterium glutamicum* eine erhöhte D-Pantothenatbildung.

[0014] Zur Erzielung einer Verstärkung (Überexpression) erhöht man z. B. die Kopienzahl der entsprechenden Gene oder mutiert die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet. In gleicher Weise wirken Expressionskassetten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Durch induzierbare Promotoren ist es zusätzlich möglich die Expression im Verlaufe der fermentativen D-Pantothenatbildung zu steigern. Durch Maßnahmen zur Verlängerung der Lebensdauer der m-RNA wird ebenfalls die Expression verbessert. Weiterhin wird durch Verhinderung des Abbaus des Enzymproteins ebenfalls die Enzymaktivität verstärkt. Die Gene oder Genkonstrukte liegen dabei entweder in Plasmidvektoren mit unterschiedlicher Kopienzahl vor oder sind im Chromosom integriert und amplifiziert. Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Anleitungen hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Martin et al. (Bio/Technology 5, 137-146 (1987)), bei Guerrero et al. (Gene 138, 35-41 (1994)), Tsuchiya und Morinaga (Bio/Technology 6, 428-430 (1988)), bei Eikmanns et al. (Gene 102, 93-98 (1991)), in der Europäischen Patentschrift EPS 0 472 869, im US Patent 4,601,893, bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9, 84-87 (1991)), bei Reinscheid et al. (Applied and Environmental Microbiology 60, 126-132 (1994)), bei LaBarre et al. (Journal of Bacteriology 175, 1001-1007 (1993)), in der Patentanmeldung WO 96/15246, bei Jensen und Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58, 191-195 (1998)) oder im Handbuch „Manual of Methods for General Bacteriology der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie.

[0015] Zur Isolierung der Gene panB und panC aus *C. glutamicum* wird zunächst eine Genbank dieses Mikroorganismus in *E. coli* angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des *E. coli* K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) in λ -Vektoren angelegt wurde. Bathe et al. (Molecular and General Genetics, 252:255-265, 1996) beschreiben eine Genbank von *C. glutamicum* ATCC13032, die mit Hilfe des Cosmidvektors SuperCos I (Wahl et al., 1987, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164) im *E. coli* K-12 Stamm NM554 (Raleigh et al., 1988, Nucleic Acids Research 16:1563-1575) angelegt wurde. Zur Herstellung einer Genbank von *C. glutamicum* in *E. coli* können auch Plasmide wie pBR322 (Bolivar, Life Sciences, 25, 807-818 (1979)) oder pUC19 (Norrandar et al., 1983, Gene, 26: 101-106) verwendet werden. Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α mc r , der von Grant et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87 (1990) 4645-4649) beschrieben wurde.

[0016] Die Genbank wird anschließend in einen Indikatorstamm durch Transformation (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166, 557-580, 1983) oder Elektroporation (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) eingebaut. Der Indikatorstamm zeichnet sich dadurch aus, dass er eine Mutation in dem interessierenden Gen besitzt, die einen detektierbaren Phänotyp z.B. eine Auxotrophie hervorruft. Die Indikatorstämme bzw. Mutanten sind aus publizierten Quellen oder Stammsammlungen erhältlich oder werden gegebenenfalls selbst hergestellt. Im Rahmen

der vorliegenden Erfindung ist die *E. coli* Mutante DV39 (Vallari und Rock, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), die eine Mutation im *panC*-Gen trägt, von besonderem Interesse. Ein anderes Beispiel für eine Pantothensäure-bedürftige *E. coli* Mutante ist der Stamm SJ2, der eine Mutation im *panB*-Gen trägt und vom Genetic Stock Center der Yale University (New Haven, Connecticut, USA) bezogen werden kann. Ein weiteres Beispiel ist die im Rahmen der vorliegenden Erfindung isolierte *C. glutamicum* Mutante R1277, die in dem für die Dihydroxysäuredehydratase kodierendem *ilvD*-Gen defekt ist. Nach Transformation des Indikatorstammes wie z.B. der *panB*-Mutante SJ2 mit einem rekombinanten Plasmid, welches das interessierende Gen wie z.B. das *panB*-Gen trägt, und Expression des betreffenden Gens, wird der Indikatorstamm bezüglich der entsprechenden Eigenschaft wie z.B. der Pantothensäure-Bedürftigkeit prototroph.

[0017] Das dergestalt isolierte Gen bzw. DNA-Fragment kann durch Bestimmung der Sequenz, wie z.B. bei Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA, 74:5463-5467, 1977) beschrieben, charakterisiert werden.

[0018] Auf diese Weise wurde die neue für die Gene *panB* und *panC* kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-Sequenz mit den oben beschriebenen Methoden die Aminosäuresequenzen der entsprechenden Enzyme abgeleitet. In SEQ ID NO 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *panB*-Genproduktes nämlich der Ketopantoathydroxymethyltransferase und in SEQ ID NO 3 die sich ergebende Aminosäuresequenz des *panC*-Genproduktes nämlich der Pantothensynthetase dargestellt. Weiterhin wurde auf diese Weise die neue für das *ilvD*-Gen kodierende DNA-Sequenz von *C. glutamicum* erhalten, die als SEQ ID NO 4 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist. In SEQ ID NO 5 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des *ilvD*-Genproduktes nämlich der Dihydroxysäuredehydratase dargestellt.

[0019] Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 durch einen degenerierten genetischen Code ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID NO 1 und/oder SEQ ID NO 4 hybridisieren Bestandteil der Erfindung. In der Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen d.h. funktionsneutral sind. Weiterhin ist bekannt, daß Änderungen am N- und/oder C-Terminus eines Proteins dessen Funktion nicht wesentlich beeinträchtigen oder sogar stabilisieren können. Angaben hierzu findet der Fachmann unter anderem bei Ben-Bassat et al. (Journal of Bacteriology 169:751-757 (1987)), bei O'Regan et al. (Gene 77:237-251 (1989)), bei Sahin-Toth et al. (Protein Sciences 3:240-247 (1994)), bei Hochuli et al. (Bio/Technology 6:1321-1325 (1988)) und in bekannten Lehrbüchern der Genetik und Molekularbiologie. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID NO 2, SEQ ID NO 3 und/oder SEQ ID NO 5 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

[0020] Das dergestalt charakterisierte Gen kann anschließend einzeln oder in Kombination mit anderen in einem geeigneten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Eine bekannte Methode Gene zu exprimieren bzw. überzuexprimieren besteht darin diese mit Hilfe von Plasmidvektoren zu amplifizieren, die überdies mit Expressionssignalen ausgestattet sein können. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für *Corynebacterium glutamicum* kommen z.B. die Vektoren pEKEx1 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) oder pEKEx2 (Eikmanns et al. Microbiology 140: 1817-1828 (1994) oder pECM2 (Jäger et al. Journal of Bacteriology 174(16): 5462-5465 (1992)) in Frage. Beispiele für derartige Plasmide sind pEKEx2panBC und pECM3ilvBNCD, die in den Stämmen DH5 α mcrr/pEKEx2panBC und DH5 α mcrr/pECM3ilvBNCD enthalten sind. Plasmid pEKEx2panBC ist ein *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor der die Gene *panB* und *panC* trägt. Plasmid pECM3ilvBNCD ist ein *E. coli*/*C. glutamicum* Pendelvektor der neben dem *ilvD*-Gen weiterhin die Gene *ilvBN* und *ilvC* trägt.

[0021] Die Erfinder haben weiterhin gefunden, dass sich die Verstärkung der Gene *panB* und *panC* einzeln, gemeinsam oder in Kombination mit den Genen *ilvBN*, *ilvC* und *ilvD* in solchen Mikroorganismen vorteilhaft auswirkt, die eine reduzierte Synthese der Aminosäuren Threonin und Isoleucin aufweisen. Diese reduzierte Synthese kann durch Abschwächung oder Ausschaltung der entsprechenden Biosyntheseenzyme bzw. ihrer Aktivitäten erreicht werden. Hierfür kommen zum Beispiel die Enzyme Homoserindehydrogenase, Homoserinkinase, Threoninsynthase oder auch Threonindehydratase in Frage. Eine Möglichkeit Enzyme und deren Aktivitäten abzuschwächen oder auszuschalten sind Mutageneseverfahren.

[0022] Hierzu gehören ungerichtete Verfahren, die chemische Reagenzien wie z.B. N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin oder auch UV-Bestrahlung zur Mutagenese benutzen, mit anschließender Suche der gewünschten Mikroorganismen auf Bedürftigkeit für L-Threonin oder L-Isoleucin. Verfahren zur Mutationsauslösung und Mutantensuche sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) nachgelesen werden.

[0023] Weiterhin gehören hierzu gerichtete rekombinante DNA-Techniken. Mit Hilfe dieser Methoden kann zum Beispiel das für die Threonindehydratase kodierende *ilvA*-Gen im Chromosom deletiert werden. Geeignete Methoden dazu sind bei Schäfer et al. (Gene (1994) 145: 69-73) oder auch Link et al. (Journal of Bacteriology (1998) 179: 6228-6237) beschrieben. Auch können nur Teile des Gens deletiert werden, oder auch mutierte Fragmente des Threonindehydratasesegens ausgetauscht werden. Durch Deletion oder Austausch wird so ein Verlust oder eine Reduktion der Threonindehydrataseaktivität erreicht (Möckel et al., (1994) Molecular Microbiology 13: 833-842; Morbach et al., (1996) Applied Microbiology and Biotechnology 45: 612-620). Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der *C. glutamicum* Stamm ATCC13032 Δ *ilvA*, der eine Deletion im *ilvA*-Gen trägt.

[0024] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch - Verfahren (Satzkultivierung) oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothersäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden sind im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

[0025] Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedenerer Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlehydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Kaliumdihydrogenphosphat oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies zur zusätzlichen Steigerung der Pantothersäure-Produktion Vorstufen der Pantothersäure wie z. B. Aspartat, β -Alanin; Ketolsovalerat, Ketopantoat, Pantoat und gegebenenfalls deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüttert werden.

[0026] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester eingesetzt werden. Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothersäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

[0027] Die Konzentration an gebildeter Pantothersäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden. Zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantothersäure wird gebräuchlicherweise der Stamm *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 eingesetzt (U.S. Pharmacopeia 1980; AOAC International 1980). Darüberhinaus werden auch andere Testorganismen, wie z.B. *Pediococcus acidilactici* NCIB6990 zur mikrobiologischen Bestimmung von Pantothenatkonzentrationen eingesetzt (Sollberg and Hegna; Methods in Enzymology 62, 201-204 (1979)).

[0028] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

- *Escherichia coli* K12 Stamm DH5 α mcr/pEKEx2panBC als DSM12456
- *Escherichia coli* K12 Stamm DH5 α mcr/pECM3ilvBNCD als DSM12457
- *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 Δ *ilvA* als DSM12455

Beispiele

[0029] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

Klonierung, Sequenzierung und Expression der Gene der Pantothenatbiosynthese panB und panC aus *C. glutamicum*

5 1. Klonierung des panB- und des panC-Gens

[0030] Chromosomale DNA von *C. glutamicum* ATCC13032 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert und mit der Restriktionsendonuklease Sau3A geschnitten. Nach geelektrophoretischer Auftrennung wurden DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 3 bis 7 kb bzw. von 9 bis 20 kb extrahiert und
 10 nachfolgend in die singuläre BamHI Schnittstelle des Vektors pBR322 ligiert. Mit den Ligationsansätzen wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mc^r (Grant et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA, 87 (1990) 4645-4649) transformiert (Hanahan, Journal of Molecular Biology 166 (1983) 557-580). Inserttragende Kolonien wurden anhand ihrer Tetracyclinsensitivität nach Überimpfen auf 10 μ g/ml Tetracyclin enthaltende LB-Agarplatten identifiziert. Durch Plasmidpräparationen (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold
 15 Spring Harbour Laboratory Press) von vereinigten Klonen wurden 8 Gruppen, welche je 400 Plasmide mit einer Insertgröße von 9 bis 20 kb und 9 Gruppen, welche je 500 Plasmide mit einer Insertgröße von 3 bis 7 kb enthielten isoliert. Die *E. coli* panB Mutante SJ2 (Cronan et al. 1982, Journal of Bacteriology 149: 916-922) wurde mit dieser Genbank mittels Elektroporation (Wehrmann et al. 1994, Microbiology 140: 3349-3356) transformiert. Die Transformationsansätze wurden direkt auf CGXII-Medium mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603)
 20 ausplattiert. Von Klonen, welche in der Lage waren ohne Pantothenatsupplementation zu wachsen, wurde Plasmid-DNA isoliert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Bei 8 Plasmiden konnte durch Retransformation die Fähigkeit, den panB-Defekt der *E. coli* Mutante SJ2 heterolog zu komplementieren, bestätigt werden.

[0031] Mit diesen 8 Plasmiden wurde eine Restriktionskartierung durchgeführt. Einer der untersuchten Plasmidvektoren, im Folgendem pUR1 genannt enthielt ein Insert von 9,3 kb Länge (Abbildung 1). Die Transformation der *E. coli* panC Mutante DV39 (Vallari und Rock 1985, Journal of Bacteriology 164: 136-142) ergab, daß der Vektor pUR1 ebenfalls in der Lage war den panC Defekt dieser Mutante zu komplementieren.

2. Sequenzierung des panB- und des panC-Gens

[0032] Ein 2,2 kb großes Fragment des Inserts (Abbildung 1) von pUR1 wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. sequenziert (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Hierzu wurden zunächst mittels Exonuklease III Subklone erzeugt, die mit Hilfe von Standard Primern (Universal and reverse primer der Firma Boehringer Mannheim, Deutschland) sequenziert wurden.
 35 Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzierungsansätze erfolgte mit dem automatischem Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als SEQ ID NO 1 wiedergegeben. Die Analyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserastern. Ein offenes Leseraster von 813 bp Länge, das als panB-Gen identifiziert wurde, kodiert für ein Polypeptid von 271 Aminosäuren und ist
 40 als SEQ ID NO 2 wiedergegeben. Das zweite offene Leseraster, das als panC-Gen identifiziert wurde, umfaßt 837 Basenpaare. Es kodiert für ein Polypeptid von 279 Aminosäuren, das als SEQ ID NO 3 wiedergegeben ist.

3. Expression des panB- und des panC-Gens

[0033] Die Gene panB und panC wurden in den *C. glutamicum* Expressionsvektor pEKEx2 kloniert (Eikmanns et al. 1994, Microbiology 140: 1817-1828 (1994)), in welchem die beiden Gene unter der Kontrolle des starken, durch IPTG induzierbaren tac-Promotors vorliegen. Die Klonierung wurde in zwei Schritten durchgeführt. Zunächst wurde mittels PCR der Anfang des panB Gens amplifiziert. Hierzu wurde mit Hilfe eines entsprechenden Primers 19 bp vor dem Startcodon von panB eine Sall-Schnittstelle eingefügt (Primer 1: 5'GATCGTCGACCATCACATCTATACTCATGCCC 3'). Der zweite Primer wurde so gewählt, daß die panB interne EcoRI Schnittstelle im amplifizierten Fragment enthalten war (Primer 2: 5'ACCCG ATGTGGCCGACAACC 3'). Die PCR wurde mit einer Annealingtemperatur von 62°C und dem Plasmid pUR1 als Matrize nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)) durchgeführt. Das resultierende 468 bp große PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsendonukleasen Sall und EcoRI geschnitten und in den ebenso behandelten Vektor pEKEx2 ligiert. Mit dem
 50 Ligationsansatz wurde der *E. coli* Stamm DH5 α mc^r transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 α mc^r/pEKEx2panB' wurde der Vektor pEKEx2panB' isoliert.

[0034] Aus dem Plasmid pUR1 wurde nun ein 1761 bp großes, die zweite Hälfte des panBC-Clusters enthaltendes, EcoRI Fragment mittels Restriktionsverdau ausgeschnitten. Dieses wurde in den schon das panB PCR-Produkt enthal-

tenden, zuvor mit EcoRI linearisierten pEKEx2panB' Vektor kloniert. Mit dem entsprechenden Ligationsansatz wurde der E. coli Stamm DH5 α mcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5 α mcr/pEKEx2panBC wurde der Vektor pEKEx2panBC (Abbildung 2) isoliert, in dem das panBC-Gencluster unter der Kontrolle des lac-Promotors vorliegt.

5 Beispiel 2

Klonierung und Sequenzierung des für die Dihydroxysäuredehydratase kodierenden ilvD-Gens aus C. glutamicum

1. Isolierung einer ilvD Mutante von C. glutamicum

10

[0035] Der Stamm C. glutamicum R127 (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) wurde mit N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin mutagenisiert (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press). Dazu wurden 5 ml einer über Nacht angezogenen C. glutamicum Kultur mit 250 μ l N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (5 mg/ml Dimethylformamid) versetzt und 30 Minuten bei 30°C und 200 Upm inkubiert (Adelberg 1958, Journal of Bacteriology 76: 326). Die Zellen wurden anschließend zweimal mit steriler NaCl-Lösung (0,9 %) gewaschen. Durch Replikaplatting auf Minimalmediumplatten CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al Journal of Bacteriology 175: 5595-5603), wurden Mutanten isoliert, die nur bei Zugabe von L-Valin, L-Isoleucin und L-Leucin (je 0,1 g/l) wuchsen.

15

[0036] Die Enzymaktivität der Dihydroxysäuredehydratase wurde im Rohextrakt dieser Mutanten bestimmt. Dazu wurden die Klone in 60 ml LB-Medium kultiviert und in der exponentiellen Wachstumsphase abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 0,05 M Kaliumphosphatpuffer gewaschen und im selben Puffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels 10 minütiger Ultraschallbehandlung (Branson-Sonifier W-250, Branson Sonic Power Co, Danbury, USA). Anschließend wurden die Zelltrümmer durch eine 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4 °C abgetrennt und der Überstand als Rohextrakt in den Enzymtest eingesetzt. Der Reaktionsansatz des Enzymtests enthielt 0,2 ml 0,25 M Tris/HCl, pH 8, 0,05 ml Rohextrakt, und 0,15 ml 65 mM α , β -Dihydroxy- β -methylvalerat. Die Testansätze wurden bei 30 °C inkubiert, nach 10, 20 und 30 Minuten 200 μ l Proben genommen und deren Ketomethylvaleratkonzentration mittels HPLC-Analytik bestimmt (Hara et al. 1985, Analytica Chimica Acta 172: 167-173). Wie Tabelle 1 zeigt, weist der Stamm R127/7 keine Dihydroxysäuredehydrataseaktivität auf, wogegen die Isomero-reduktase und Acetohydroxysäuresynthase Aktivitäten als weitere Enzyme der Synthese der verzweigtkettigen Aminosäuren noch vorhanden sind.

30

Tabelle 1

35

| Spezifische Aktivitäten (μ mol/min und mg Protein) verschiedener Enzyme in C. glutamicum Stämmen | | | |
|---|----------------------------|-------------------|----------------------------|
| Stamm | Dihydroxysäure dehydratase | Isomero reduktase | Acetohydroxysäure synthase |
| R127 | 0,003 | 0,05 | 0,07 |
| R127/7 | 0,000 | 0,06 | 0,09 |

40

2. Klonierung des ilvD-Gens von C. glutamicum

[0037] Chromosomale DNA aus C. glutamicum R127 wurde wie bei Schwarzer und Pühler (Bio/Technology 9 (1990) 84-87) beschrieben isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A (Boehringer Mannheim) gespalten und durch Saccharose-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) aufgetrennt. Die Fraktion mit dem Fragmentgrößenbereich von etwa 6-10 kb wurde zur Ligation mit dem Vektor pJC1 (Cremer et al., Molecular and General Genetics 220 (1990) 478-480) eingesetzt. Der Vektor pJC1 wurde hierzu mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurden mit 20 ng der genannten Fraktion der chromosomalen DNA ligiert und damit die Mutante R127/7 durch Elektroporation (Haynes und Britz, FEMS Microbiology Letters 61 (1989) 329-334) transformiert. Die Transformanten wurden auf die Fähigkeit getestet auf CGXII Agarplatten ohne Zugabe der verzweigtkettigen Aminosäuren wachsen zu können. Von über 5000 getesteten Transformanten wuchsen nach Replikaplatting und zweitägiger Inkubation bei 30°C 8 Klone auf Minimalmediumplatten. Von diesen Klonen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84-87) beschrieben durchgeführt. Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA ergaben, daß in allen 8 Klonen dasselbe Plasmid, im Folgendem pRV genannt, enthalten war. Das Plasmid trägt ein Insert von 4,3 kb und wurde durch Retransformation auf seine Fähigkeit die ilvD-Mutante R127/7 zu komplementieren getestet. Durch Subklonierung

55

wurde der für die Komplementation der Mutante R127/7 verantwortliche Bereich auf ein 2,9 kb Scal/XhoI-Fragment eingegrenzt.

3. Sequenzierung des *ilvD*-Gens

[0038] Die Nukleinsäuresequenz des 2,9 kb Scal/XhoI-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. durchgeführt (Proceedings of the National of Sciences of the United States of America USA (1977) 74: 5463-5467). Dabei wurde der Auto-Read Sequencing kit verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden). Die gelelektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischem Laser-Fluoreszenz Sequenziergerät (A.L.F.) von Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 4.0, EMBL, Cambridge, GB) analysiert. Die Nukleotidsequenz ist als ID SEQ NO 4 wiedergegeben. Die Analyse ergab ein offenes Leseraster von 1836 Basenpaaren, das als *ilvD*-Gen identifiziert wurde und für ein Polypeptid von 612 Aminosäuren kodiert, das als SEQ ID NO 5 wiedergegeben ist.

Beispiel 3

Konstruktion einer *ilvA* Deletionsmutante von *C. glutamicum*

[0039] Der Einbau einer Deletion in das *ilvA*-Gen von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde mit dem bei Schäfer et al. (Gene 145: 69-73 (1994)) beschriebenen System zum Genaustausch durchgeführt. Zur Konstruktion des Inaktivierungsvektors pK19mobsacBΔ*ilvA* wurde zunächst aus dem auf einem EcoRI-Fragment im Vektor pBM21 (Möckel et al. 1994, Molecular Microbiology 13: 833-842) vorliegenden *ilvA*-Gen ein internes 241 bp BglII-Fragment entfernt. Hierzu wurde der Vektor mit BglII geschnitten und, nach Abtrennung des *ilvA* internen BglII-Fragmentes mittels Agarosegelelektrophorese, religiert. Anschließend wurde aus dem Vektor das unvollständige Gen als EcoRI-Fragment isoliert und in den mit EcoRI linearisierten Vektor pK19mobsacB (Schäfer 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der erhaltene Inaktivierungsvektor pK19mobsacBΔ*ilvA* wurde durch Transformation in den *E. coli* Stamm S 17-1 eingebracht (Hanahan 1983, Journal of Molecular Biology 166: 557-580) und per Konjugation nach *C. glutamicum* ATCC13032 transferiert (Schäfer et al. 1990, Journal of Bacteriology 172: 1663-1666). Es wurden Kanamycin-resistente Klone von *C. glutamicum* erhalten, bei denen der Inaktivierungsvektor im Genom integriert vorlag. Um auf die Excision des Vektors zu selektionieren, wurden Kanamycin-resistente Klone auf Saccharose-haltigem LB-Medium ((Sambrook et al., Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press)) mit 15 g/l Agar, 2% Glucose/10% Saccharose) ausplattiert und Kolonien erhalten, welche den Vektor durch ein zweites Rekombinationsereignis wieder verloren haben (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465). Durch Überimpfen auf Minimalmediumplatten (Medium CGXII mit 15 g/l Agar (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175 (1993) 5595-5603)) mit und ohne 2 mM L-Isoleucin, bzw. mit und ohne 50 µg/ml Kanamycin wurden 36 Klone isoliert, welche durch die Excision des Vektors Kanamycin sensitiv und Isoleucin auxotroph waren und bei denen nun das unvollständige *ilvA* Gen (Δ*ilvA*-Allel) im Genom vorlag. Einer dieser Klone wurde als Stamm ATCC13032Δ*ilvA* bezeichnet und weiter verwendet.

Beispiel 4

Expression der Gene *ilvBN*, *ilvC* und *ilvD* in *C. glutamicum*

[0040] Die Gene der Acetohydroxysäuresynthase (*ilvBN*) und der Isomeroxydase (*ilvC*) (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116 und Keilhauer et al. 1993, Journal of Bacteriology 175: 5595-5603) und der Dihydroxysäuredehydrogenase (*ilvD*) (Beispiel 2) wurden zur Expression in den Vektor pECM3 kloniert. Der Vektor pECM3 ist ein Derivat von pECM2 (Jäger et al. 1992, Journal of Bacteriology 174: 5462-5465), das durch Deletion des ca. 1 kbp langen BamHI/BglII DNA-Fragmentes entstand, welches das Kanamycinresistenzgen trägt.

[0041] In dem Vektor pKK5 (Cordes et al. 1992, Gene 112: 113-116) lagen die Gene *ilvBNC* bereits im Vektor pJC1 (Cremer et al. 1990, Molecular and General Genetics 220: 478-480) kloniert vor. Aus diesem wurde ein 5,7 kb XbaI-*ilvBNC*-Fragment isoliert und zusammen mit einem, das *ilvD*-Gen enthaltende, 3,1 kb-XbaI Fragment des Vektors pRV in den mit XbaI linearisierten Vektor pECM3 eingebracht. Der Ligationsansatz wurde hierbei in den *E. coli* Stamm DH5αmcr transformiert. Aus einer Transformante vom Typ DH5αmcr/pECM3*ilvBNCD* wurde das Plasmid pECM3*ilvBNCD* (Abbildung 3) erhalten.

[0042] Mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Chloramphenicolresistenz wurde das Plasmid pECM3*ilvBNCD* in den Stamm ATCC13032Δ*ilvA* eingebracht und der Stamm ATCC13032Δ*ilvA*/pECM3*ilvBNCD* erhalten. Weiterhin wurde mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycinresistenz das Plasmid pEKEx2panBC in den Stamm ATCC13032 und in den Stamm ATCC13032Δ*ilvA* eingebracht und die Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und

ATCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC erhalten. In den Stamm ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD wurden mittels Elektroporation (Haynes 1989, FEMS Microbiology Letters 61: 329-334) und Selektion auf Kanamycin und Chloramphenicol die Plasmide pEKEx2panBC und pEKEx2 eingebracht. Auf diese Weise entstanden die Stämme ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 und ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC.

5

Beispiel 5

Konstruktion einer Pantothersäure bedürftigen panC-Mutante von *C. glutamicum*

10 **[0043]** Es wurde mit Hilfe des Inaktivierungsvektors pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) eine *C. glutamicum* R127 panC Mutante erzeugt.

[0044] Zur Konstruktion des panC-Inaktivierungsvektors wurde zunächst ein 168 bp großes, zentrales Fragment des panC-Gens (Nukleotid 265-432 des 837 bp umfassenden Gens) von *C. glutamicum* mittels der Polymersasekettenreaktion (PCR) amplifiziert. Als Matrize diente hier der Vektor pUR1 (s. Beispiel 6); als Primer wurden die beiden
15 20mere Primer 1 und Primer 2 eingesetzt: Primer 1 5' GTTCGCACCCGATGTGGAGG 3', Primer 2 5' ATGCACGAT-CAGGGCGCACC 3'. Die PCR wurde nach Sambrook et al. (Molecular cloning. A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) mit einer Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt. Das erhaltene Fragment wurde nach Zwischenklonierung in die SmaI Schnittstelle des Vektors pUC18, als EcoRI/SalI Fragment gerichtet in den Inaktivierungsvektor pK18mob (Schäfer et al. 1994, Gene 145: 69-73) ligiert. Der so erhaltene Vektor pK18mob'panC' wurde
20 zur Transformation des *E. coli*-Stammes S 17-1 benutzt und nachfolgend per Konjugation in *C. glutamicum* R127 eingebracht. Durch Selektion auf Kanamycinresistenz wurden so Klone von *C. glutamicum* R127 erhalten, bei denen der Integrationsvektor durch ein homologes Rekombinationsereignis ins panC-Gen integriert ist. Der so erhaltene Stamm R127panC::pK18mob'panC' ist zur D-Pantothenatbestimmung geeignet.

25 Beispiel 6

Quantitative Bestimmung von D-Pantothenat

[0045] Zur quantitativen Bestimmung von D-Pantothenat wurde die *C. glutamicum* panC Mutante R127panC::pK18mob'panC' konstruiert (siehe Beispiel 5), deren Wachstum direkt von der D-Pantothenat Konzentration des Mediums abhängig ist. Dieser Stamm ist Pantothersäure auxotroph und zeigt bei Supplementation mit β -Alanin und D-Pantoat kein Wachstum.

[0046] Zur Bestimmung von Pantothenat mit diesem Indikatorstamm wurde CGXII-Medium (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) als Testmedium eingesetzt. Dazu wurden je 3 ml 4/3 fach konzentriertes
35 CGXII-Medium in einem Inkubationsröhrchen (Falcon 2057, Becton and Dickinson, New Jersey, USA) mit 1 ml Pantothersäure-haltiger, steriler Eich- oder Probelösung versetzt und mit dem Indikatorstamm inokuliert. Als Inokulum wurden jeweils 60 μ l einer Glyzerinkultur des Indikatorstammes eingesetzt. Nach 40 stündiger Inkubation bei 30°C wurde die Zelldichte (OD₆₀₀) (Novaspec 4049 Spectrophotometer, LKB Biochrom, Cambridge, GB) der Testansätze bestimmt und mittels einer Eichkurve die Pantothersäurekonzentration ermittelt. Der Stamm weist bis zu einer Konzentration von
40 25 μ g/l eine lineare Abhängigkeit des Wachstums von der Pantothenatkonzentration auf, bei einer optischen Dichte von 0,5 bis 10. Zur Herstellung der Glyzerinkultur des Indikatorstammes wurde dieser Stamm auf unsupplementiertem CGXII-Medium 24 Stunden inkubiert (Aushungerung an D-Pantothenat). 1050 μ l der Kultur wurden anschließend mit 700 μ l Glyzerin versetzt. Von dieser bei -70°C zwischengefrorenen Glyzerinkultur wurden 60 μ l zu Bestimmung von D-Pantothenat, wie zuvor beschrieben benutzt. Als Referenz wurde Na-Pantothenat verwendet, das von der Firma Sigma
45 (Deisenhofen, Deutschland) bezogen wurde.

Beispiel 7

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen *C. glutamicum* Stämmen

50

[0047] Zur Untersuchung ihrer Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032, ATCC13032/pEKEx2panBC, ATCC13032 Δ ilvA und ATCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD₆₀₀ von 0,5 betrug. Das
55 Medium war identisch mit dem bei Keilhauer et al., (Journal of Bacteriology (1993) 175: 5595-5603) beschriebenen Medium, enthielt aber zusätzlich 2 mM L-Isoleucin. Das von Keilhauer et al. beschriebene Medium CgXII ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

| Zusammensetzung des Mediums CGXII | |
|--|---------------|
| Komponente | Konzentration |
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 20 g/L |
| Harnstoff | 5 g/L |
| KH_2PO_4 | 1 g/L |
| K_2HPO_4 | 1 g/L |
| $\text{Mg}_2\text{O}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 0,25 g/L |
| 3-Morpholinopropansulfon- säure | 42 g/L |
| CaCl_2 | 10 mg/L |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 10 mg/L |
| $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | 10 mg/L |
| $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ | 1 mg/L |
| CuSO_4 | 0,2 mg/L |
| $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ | 0,02 mg/L |
| Biotin (pH7) | 0,2 mg/L |
| Glukose | 40 g/L |
| Protokatechusäure | 0,03 mg/L |

[0048] Bei der Kultivierung der Stämme ATCC13032/pEKEx2panBC und Stammes ATCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC wurde das Medium nach 5 Stunden zusätzlich mit 1 mM Isopropylthio- β -D-galactosid versetzt. Nach 24 stündiger Kultivierung wurden Proben genommen, die Zellen abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde mit Hilfe des im Beispiel 6 beschriebenen Pantothenat-tests bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3

| D-Pantothenatbildung in verschiedenen C. glutamicum Stämmen | |
|--|----------------------|
| Stamm | D-Pantothenat (mg/l) |
| ATCC13032 | 0,01 |
| ATCC13032/pEKEx2panBC | 0,03 |
| ATCC13032 Δ ilvA | 0,06 |
| ATCC13032 Δ ilvA/pEKEx2panBC | 0,3 |

Beispiel 9

Produktion von D-Pantothenat mit verschiedenen C. glutamicum Stämmen bei β -Alanin Zugabe

[0049] Zur Quantifizierung der Pantothenatbildung wurden die Stämme ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 und ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC in 60 ml Brain Heart Infusion-Medium (Difco Laboratories, Detroit, USA) mit 25 mg/l Kanamycin und 3 mg/l Chloramphenicol für 14 Stunden bei 30°C vorkultiviert, zweimal mit 0,9% NaCl-Lösung (w/v) gewaschen und mit dieser Suspension je 60 ml CgXII-Medium so angeimpft, daß die OD₆₀₀ 0,5 betrug. Das Medium enthielt hierbei 2 mM L-Isoleucin, 25 mg/l Kanamycin, 3 mg/l Chloramphenicol und β -Alanin in

einer Endkonzentration von 20 mM. Nach 5 stündiger Kultivierung wurde dem Medium jeweils IPTG (Isopropylthio- β -D-galactosid) in einer Endkonzentration von 1 mM zugefügt. Nach 49 und 74 Stunden wurde eine Probe entnommen, die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand sterilfiltriert. Die Pantothenatkonzentration des Überstands wurde wie in Beispiel 6 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

| D-Pantothenatakkumulation in verschiedenen Stämmen von <i>C. glutamicum</i> | | |
|---|---|------------|
| Stamm | D-Pantothenat [mg/l] nach einer Inkubationszeit von | |
| | 49 Stunden | 74 Stunden |
| ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2 | 80 | 100 |
| ATCC13032 Δ ilvA/pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC | 920 | 980 |

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Degussa Aktiengesellschaft
- (B) STRASSE: Weissfrauenstr. 9
- (C) ORT: Frankfurt am Main
- (D) BUNDESLAND: Hessen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-60311

- (A) NAME: Forschungszentrum Juelich GmbH
- (B) STRASSE: Leo-Brandt Strasse
- (C) ORT: Juelich
- (D) BUNDESLAND: Nordrhein-Westfalen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-52425

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Verfahren zur
fermentativen Herstellung von D-Pantothenasaeure
unter Verwendung coryneformer Bakterien

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 5

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRAEGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version
#1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LAENGE: 2164 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(vi) URSPRUENGLICHE HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum
- (B) STAMM: ATCC13032

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS

(B) LAGE:351..1163

(D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 351

/EC_number= 4.1.2.12

/product=

"Ketopantoathydroxymethyltransferase"

/gene= "panB"

(ix) MERKMAL:

(A) NAME/SCHLUESSEL: CDS

(B) LAGE:1166..2002

(D) SONSTIGE ANGABEN:/codon_start= 1166

/EC_number= 6.3.2.1

/product= "Pantothenatsynthetase"

/gene= "panC"

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | |
|---|-------------|
| GCTTCGGGGT ACCAATTCCT TTAAGAACCA TCAGATCAAT CTGTTGTACA TTCTCGGCCA | 60 |
| GATTCAGCTT TTCGGTAAGG ACGAAACACT TTCACCTGAA TCGGCAGCAA AGTTTCTTAA | 120 |
| AGTTTCTAAG GCAACTGCAA CGAGGTATTT TAGAACTCTC CGAGAAATGG AATTAGTTCA | 180 |
| CGAGGTCAGC AAACGCCCTT TCGGGTTTGC GCTCACGGAT AAAGGTCGTG AGATAGTAGG | 240 |
| TCTTGAGSTA AAAATTTGAC TCCATAACGA GAACTTAATC GAGCAACACC CCTGAACAGT | 300 |
| GAATCAAATC GGAATTTATT TATTCTGAGC TGGTCATCAC ATCTATACTC ATG CCC | 356 |
| | Met Pro |
| | 1 |
| ATG TCA GGC ATT GAT GCA AAG AAA ATC CGC ACC CGT CAT TTC CGC GAA | 404 |
| Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe Arg Glu | |
| | 5 10 15 |
| GCT AAA GTA AAC GGC CAG AAA GTT TCG GTT CTC ACC AGC TAT GAT GCG | 452 |
| Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr Asp Ala | |
| | 20 25 30 |
| CTT TCG GCG CGC ATT TTT GAT GAG GCT GGC GTC GAT ATG CTC CTT GTT | 500 |
| Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu Leu Val | |
| | 35 40 45 50 |
| GGT GAT TCC GCT GCC AAC GTT GTG CTG GGT CGC GAT ACC ACC TTG TCG | 548 |
| Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr Leu Ser | |
| | 55 60 65 |
| ATC ACC TTG GAT GAG ATG ATT GTG CTG GCC AAG GCG GTG ACG ATC GCT | 596 |
| Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr Ile Ala | |
| | 70 75 80 |
| ACG AAG CGT GCG CTT GTG GTG GTT GAT CTG CCG TTT GGT ACC TAT GAG | 644 |
| Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr Tyr Glu | |
| | 85 90 95 |
| GTG AGC CCA AAT CAG GCG GTG GAG TCC GCG ATC CGG GTC ATG CGT GAA | 692 |
| Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met Arg Glu | |
| | 100 105 110 |
| ACG GGT GCG GCT GCG GTG AAG ATC GAG GGT GGC GTG GAG ATC GCG CAG | 740 |

EP 1 006 189 A2

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | Thr | Gly | Ala | Ala | Ala | Val | Lys | Ile | Glu | Gly | Gly | Val | Glu | Ile | Ala | Gln | |
| | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | | | 130 | |
| 5 | ACG | ATT | CGA | CGC | ATT | GTT | GAT | GCT | GGA | ATT | CCG | GTT | GTC | GGC | CAC | ATC | 788 |
| | Thr | Ile | Arg | Arg | Ile | Val | Asp | Ala | Gly | Ile | Pro | Val | Val | Gly | His | Ile | |
| | | | | | 135 | | | | | 140 | | | | | 145 | | |
| | GGG | TAC | ACC | CCG | CAG | TCC | GAG | CAT | TCC | TTG | GGC | GGC | CAC | GTG | GTT | CAG | 836 |
| | Gly | Tyr | Thr | Pro | Gln | Ser | Glu | His | Lys | Leu | Gly | Gly | His | Val | Val | Gln | |
| 10 | | | | 150 | | | | | 155 | | | | | 160 | | | |
| | GGT | CGT | GGC | GCG | AGT | TCT | GGA | AAG | CTC | ATC | GCC | GAT | GCC | CGC | GCG | TTG | 884 |
| | Gly | Arg | Gly | Ala | Ser | Ser | Gly | Lys | Leu | Ile | Ala | Asp | Ala | Arg | Ala | Leu | |
| | | | 165 | | | | | 170 | | | | | 175 | | | | |
| | GAG | CAG | GCG | GGT | GCG | TTT | GCG | GTT | GTG | TTG | GAG | ATG | GTT | CCA | GCA | GAG | 932 |
| 15 | Glu | Gln | Ala | Gly | Ala | Phe | Ala | Val | Val | Leu | Glu | Met | Val | Pro | Ala | Glu | |
| | | | 180 | | | | 185 | | | | | 190 | | | | | |
| | GCA | GCG | CGC | GAG | GTT | ACC | GAG | GAT | CTT | TCC | ATC | ACC | ACT | ATC | GGA | ATC | 980 |
| | Ala | Ala | Arg | Glu | Val | Thr | Glu | Asp | Leu | Ser | Ile | Thr | Thr | Ile | Gly | Ile | |
| | 195 | | | | | 200 | | | | | 205 | | | | 210 | | |
| 20 | GGT | GCC | GGC | AAT | GGC | ACA | GAT | GGG | CAG | GTT | TTG | GTG | TGG | CAG | GAT | GCC | 1028 |
| | Gly | Ala | Gly | Asn | Gly | Thr | Asp | Gly | Gln | Val | Leu | Val | Trp | Gln | Asp | Ala | |
| | | | | 215 | | | | | 220 | | | | | 225 | | | |
| | TTC | GGC | CTC | AAC | CGC | GGC | AAG | AAG | CCA | CGC | TTC | GTC | CGC | GAG | TAC | GCC | 1076 |
| 25 | Phe | Gly | Leu | Asn | Arg | Gly | Lys | Lys | Pro | Arg | Phe | Val | Arg | Glu | Tyr | Ala | |
| | | | | 230 | | | | | | | 235 | | | | | | 240 |
| | ACC | TTG | GGC | GAT | TCC | TTG | CAC | GAC | GCC | GCG | CAG | GCC | TAC | ATC | GCC | GAT | 1124 |
| | Thr | Leu | Gly | Asp | Ser | Leu | His | Asp | Ala | Ala | Gln | Ala | Tyr | Ile | Ala | Asp | |
| | | | 245 | | | | | 250 | | | | | 255 | | | | |
| 30 | ATC | CAC | GCG | GGT | ACC | TTC | CCA | GGC | GAA | GCG | GAG | TCC | TTT | TA | ATG | CAG | 1171 |
| | Ile | His | Ala | Gly | Thr | Phe | Pro | Gly | Glu | Ala | Glu | Ser | Phe | Met | Gln | | |
| | | 260 | | | | | 265 | | | | | 270 | | 1 | | | |
| | GTA | GCA | ACC | ACA | AAG | CAG | GCG | CTT | ATC | GAC | GCC | CTC | CTC | CAC | CAC | AAA | 1219 |
| | Val | Ala | Thr | Thr | Lys | Gln | Ala | Leu | Ile | Asp | Ala | Leu | Leu | His | His | Lys | |
| 35 | | | 5 | | | | 10 | | | | | 15 | | | | | |
| | TCC | GTC | GGG | CTC | GTC | CCC | ACC | ATG | GGT | GCG | CTA | CAC | AGC | GGA | CAC | GCC | 1267 |
| | Ser | Val | Gly | Leu | Val | Pro | Thr | Met | Gly | Ala | Leu | His | Ser | Gly | His | Ala | |
| | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | | | | |
| | TCG | TTG | GTT | AAA | GCA | GCA | CGC | GCT | GAA | AAC | GAC | ACT | GTT | GTA | GCC | AGT | 1315 |
| 40 | Ser | Leu | Val | Lys | Ala | Ala | Arg | Ala | Glu | Asn | Asp | Thr | Val | Val | Ala | Ser | |
| | | 35 | | | | 40 | | | | | 45 | | | | 50 | | |
| | ATT | TTT | GTC | AAT | CCC | CTG | CAG | TTT | GAA | GCA | CTC | GGT | GAT | TGC | GAT | GAT | 1363 |
| | Ile | Phe | Val | Asn | Pro | Leu | Gln | Phe | Glu | Ala | Leu | Gly | Asp | Cys | Asp | Asp | |
| | | | | 55 | | | | | 60 | | | | | 65 | | | |
| 45 | TAC | CGC | AAC | TAT | CCC | CGC | CAA | CTC | GAC | GCC | GAT | TTA | GCA | CTG | CTT | GAA | 1411 |
| | Tyr | Arg | Asn | Tyr | Pro | Arg | Gln | Leu | Asp | Ala | Asp | Leu | Ala | Leu | Leu | Glu | |
| | | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | |
| | GAG | GCA | GGT | GTG | GAT | ATT | GTG | TTC | GCA | CCC | GAT | GTG | GAG | GAA | ATG | TAC | 1459 |
| | Glu | Ala | Gly | Val | Asp | Ile | Val | Phe | Ala | Pro | Asp | Val | Glu | Glu | Met | Tyr | |
| | | | 85 | | | | 90 | | | | | | 95 | | | | |
| 50 | CCC | GGT | GGC | TTG | CCA | CTA | GTG | TGG | GCG | CGC | ACC | GGT | TCC | ATC | GGA | ACA | 1507 |
| | Pro | Gly | Gly | Leu | Pro | Leu | Val | Trp | Ala | Arg | Thr | Gly | Ser | Ile | Gly | Thr | |
| | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | | | |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

EP 1 006 189 A2

| | | |
|----|---|------|
| | AAA TTG GAG GGT GCC AGC AGG CCT GGC CAT TTC GAT GGT GTG GCT ACC | 1555 |
| | Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val Ala Thr | |
| | 115 120 125 130 | |
| 5 | GTG GTG GCG AAG CTG TTC AAT TTG GTG CGC CCT GAT CGT GCA TAT TTT | 1603 |
| | Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala Tyr Phe | |
| | 135 140 145 | |
| | GGA CAA AAA GAT GCT CAG CAG GTT GCG GTG ATT CGG CGA TTG GTT GCC | 1651 |
| | Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu Val Ala | |
| 10 | 150 155 160 | |
| | GAT CTA GAC ATT CCC GTG GAG ATT CGT CCC GTT CCG ATT ATT CGT GGC | 1699 |
| | Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile Arg Gly | |
| | 165 170 175 | |
| | GCC GAT GGC TTA GCC GAA TCC AGC CGC AAT CAA CGT CTT TCT GCG GAT | 1747 |
| 15 | Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser Ala Asp | |
| | 180 185 190 | |
| | CAG CGA GCG CAA GCT CTG GTG CTG CCG CAG GTG TTG AGT GGG TTG CAG | 1795 |
| | Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly Leu Gln | |
| | 195 200 205 210 | |
| 20 | CGT CGA AAA GCA GCT GGT GAA GCG CTA GAT ATC CAA GGT GCG CGC GAC | 1843 |
| | Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala Arg Asp | |
| | 215 220 225 | |
| | ACC TTG GCC AGC GCC GAC GGC GTG CGC TTG GAT CAC CTG GAA ATT GTC | 1891 |
| | Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu Ile Val | |
| 25 | 230 235 240 | |
| | GAT CCA GCC ACC CTC GAA CCA TTA GAA ATC GAC GGC CTG CTC ACC CAA | 1939 |
| | Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu Thr Gln | |
| | 245 250 255 | |
| | CCA GCG TTG GTG GTC GGC GCG ATT TTC GTG GGG CCG GTG CGG TTG ATC | 1987 |
| 30 | Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg Leu Ile | |
| | 260 265 270 | |
| | GAC AAT ATC GAG CTC TAGTACCAAC CCTGCGTTGC AGCACGCAGC TTCGCATAAC | 2042 |
| | Asp Asn Ile Glu Leu | |
| | 275 | |
| 35 | GCGTGCTCAG CTCAGTGTTT TTAGTGCGC GGTGCGGATC GGAACCGGGA GTTGCCCACT | 2102 |
| | GCGGTGGCGT GGCCTCACCC GACAGCGCCC ATGCCGCCTG ACGAGCTGCA CCCAACGCCA | 2162 |
| | CA | 2164 |
| 40 | (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2: | |
| | (i) SEQUENZKENNZEICHEN: | |
| | (A) LAENGE: 271 Aminosaeuren | |
| | (B) ART: Aminosaeure | |
| | (D) TOPOLOGIE: linear | |
| 45 | (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein | |
| | (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2: | |
| | Met Pro Met Ser Gly Ile Asp Ala Lys Lys Ile Arg Thr Arg His Phe | |
| | 1 5 10 15 | |
| 50 | Arg Glu Ala Lys Val Asn Gly Gln Lys Val Ser Val Leu Thr Ser Tyr | |
| | 20 25 30 | |
| | Asp Ala Leu Ser Ala Arg Ile Phe Asp Glu Ala Gly Val Asp Met Leu | |
| 55 | | |

EP 1 006 189 A2

35 40 45

5 Leu Val Gly Asp Ser Ala Ala Asn Val Val Leu Gly Arg Asp Thr Thr
50 55 60

Leu Ser Ile Thr Leu Asp Glu Met Ile Val Leu Ala Lys Ala Val Thr
65 70 75 80

Ile Ala Thr Lys Arg Ala Leu Val Val Val Asp Leu Pro Phe Gly Thr
85 90 95

10 Tyr Glu Val Ser Pro Asn Gln Ala Val Glu Ser Ala Ile Arg Val Met
100 105 110

Arg Glu Thr Gly Ala Ala Ala Val Lys Ile Glu Gly Gly Val Glu Ile
115 120 125

15 Ala Gln Thr Ile Arg Arg Ile Val Asp Ala Gly Ile Pro Val Val Gly
130 135 140

His Ile Gly Tyr Thr Pro Gln Ser Glu His Ser Leu Gly Gly His Val
145 150 155 160

20 Val Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Lys Leu Ile Ala Asp Ala Arg
165 170 175

Ala Leu Glu Gln Ala Gly Ala Phe Ala Val Val Leu Glu Met Val Pro
180 185 190

25 Ala Glu Ala Ala Arg Glu Val Thr Glu Asp Leu Ser Ile Thr Thr Ile
195 200 205

Gly Ile Gly Ala Gly Asn Gly Thr Asp Gly Gln Val Leu Val Trp Gln
210 215 220

30 Asp Ala Phe Gly Leu Asn Arg Gly Lys Lys Pro Arg Phe Val Arg Glu
225 230 235 240

Tyr Ala Thr Leu Gly Asp Ser Leu His Asp Ala Ala Gln Ala Tyr Ile
245 250 255

Ala Asp Ile His Ala Gly Thr Phe Pro Gly Glu Ala Glu Ser Phe
260 265 270

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LAENGE: 279 Aminosaeuren

(B) ART: Aminosaeure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Gln Val Ala Thr Thr Lys Gln Ala Leu Ile Asp Ala Leu Leu His
1 5 10 15

45 His Lys Ser Val Gly Leu Val Pro Thr Met Gly Ala Leu His Ser Gly
20 25 30

His Ala Ser Leu Val Lys Ala Ala Arg Ala Glu Asn Asp Thr Val Val
35 40 45

50 Ala Ser Ile Phe Val Asn Pro Leu Gln Phe Glu Ala Leu Gly Asp Cys
50 55 60

Asp Asp Tyr Arg Asn Tyr Pro Arg Gln Leu Asp Ala Asp Leu Ala Leu

EP 1 006 189 A2

| | 65 | 70 | 75 | 80 |
|----|---|-----|-----|-----|
| 5 | Leu Glu Glu Ala Gly Val Asp Ile Val Phe Ala Pro Asp Val Glu Glu | 85 | 90 | 95 |
| | Met Tyr Pro Gly Gly Leu Pro Leu Val Trp Ala Arg Thr Gly Ser Ile | 100 | 105 | 110 |
| 10 | Gly Thr Lys Leu Glu Gly Ala Ser Arg Pro Gly His Phe Asp Gly Val | 115 | 120 | 125 |
| | Ala Thr Val Val Ala Lys Leu Phe Asn Leu Val Arg Pro Asp Arg Ala | 130 | 135 | 140 |
| | Tyr Phe Gly Gln Lys Asp Ala Gln Gln Val Ala Val Ile Arg Arg Leu | 145 | 150 | 155 |
| 15 | Val Ala Asp Leu Asp Ile Pro Val Glu Ile Arg Pro Val Pro Ile Ile | 165 | 170 | 175 |
| | Arg Gly Ala Asp Gly Leu Ala Glu Ser Ser Arg Asn Gln Arg Leu Ser | 180 | 185 | 190 |
| 20 | Ala Asp Gln Arg Ala Gln Ala Leu Val Leu Pro Gln Val Leu Ser Gly | 195 | 200 | 205 |
| | Leu Gln Arg Arg Lys Ala Ala Gly Glu Ala Leu Asp Ile Gln Gly Ala | 210 | 215 | 220 |
| 25 | Arg Asp Thr Leu Ala Ser Ala Asp Gly Val Arg Leu Asp His Leu Glu | 225 | 230 | 235 |
| | Ile Val Asp Pro Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Ile Asp Gly Leu Leu | 245 | 250 | 255 |
| 30 | Thr Gln Pro Ala Leu Val Val Gly Ala Ile Phe Val Gly Pro Val Arg | 260 | 265 | 270 |
| | Leu Ile Asp Asn Ile Glu Leu | 275 | | |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- | | |
|----|--|
| 35 | (i) SEQUENZKENNZEICHEN: |
| | (A) LAENGE: 2952 Basenpaare |
| | (B) ART: Nucleotid |
| | (C) STRANGFORM: Doppelstrang |
| | (D) TOPOLOGIE: linear |
| 40 | (ii) ART DES MOLEKUELS: Genom-DNA |
| | (iii) HYPOTHETISCH: NEIN |
| | (iv) ANTISENSE: NEIN |
| 45 | (vi) URSPRUENGLICHE HERKUNFT: |
| | (A) ORGANISMUS: Corynebacterium glutamicum |
| | (B) STAMM: ATCC13032 |
| | (C) INDIVIDUUM/ISOLAT: MUTANTE R127 |
| 50 | (ix) MERKMAL: |
| | (A) NAME/SCHLUESSEL: CDS |
| | (B) LAGE: 290..2125 |
| | (D) SONSTIGE ANGABEN: /codon_start= 290 |
| | /EC_number= 4.2.1.9 |
| | /product= "Dihydroxysaeuredehydratase" |
| | /gene= "ilvD" |
| 55 | |

EP 1 006 189 A2

(x1) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

| | | |
|----|--|-----|
| 5 | AGTACTTGGA GCGCCAAAAG GCACTGGGCA AGCCAGTTCA GTTGAAC TTC GATGACGACA | 60 |
| | CCGATGGGAA TACAACACAA ACAGAAAGCG TTGAATCCCA AGAGACCGGA CAAGCCGCGT | 120 |
| | CTGAAACCTC ACATCGTGAT AACCTGCGT CACAGCACTA GAGTGTAATA AGCCGTCGGA | 180 |
| | ACCAAAGGTC CACACCTCTG CACGAGTAGA AGCTCACCCA AGTTTTCAAA GTGCCGTTGA | 240 |
| 10 | TTCTTGACAA CCACCCGCCG CTCTTTAGAG CAGATTTGAA AAGCGCATC ATG ATC | 295 |
| | Met Ile 280 | |
| | CCA CTT CGT TCA AAA GTC ACC ACC GTC GGT CGC AAT GCA GCT GGC GCT | 343 |
| 15 | Pro Leu Arg Ser Lys Val Thr Thr Val Gly Arg Asn Ala Ala Gly Ala | |
| | 285 290 295 | |
| | CGC GCC CTT TGG CGT GCC ACC GGC ACC AAG GAA AAT GAG TTC GGC AAG | 391 |
| | Arg Ala Leu Trp Arg Ala Thr Gly Thr Lys Glu Asn Glu Phe Gly Lys | |
| | 300 305 310 | |
| | CCA ATT GTT GCC ATC GTA AAC TCC TAC ACC CAG TTC GTG CCC GGA CAC | 439 |
| 20 | Pro Ile Val Ala Ile Val Asn Ser Tyr Thr Gln Phe Val Pro Gly His | |
| | 315 320 325 | |
| | GTT CAC CTT AAG AAC GTC GGC GAT ATT GTG GCA GAT GCA GTG CGC AAA | 487 |
| | Val His Leu Lys Asn Val Gly Asp Ile Val Ala Asp Ala Val Arg Lys | |
| | 330 335 340 345 | |
| 25 | GCC GGT GGC GTT CCA AAG GAA TTC AAC ACC ATC GTC GAT GAC GGC ATC | 535 |
| | Ala Gly Gly Val Pro Lys Glu Phe Asn Thr Ile Val Asp Asp Gly Ile | |
| | 350 355 360 | |
| | GCC ATG GGA CAC GGC GGC ATG CTG TAC TCC CTG CCA TCC CGT GAA ATC | 583 |
| | Ala Met Gly His Gly Gly Met Leu Tyr Ser Leu Pro Ser Arg Glu Ile | |
| 30 | 365 370 375 | |
| | ATC GCC GAC TCC GTC GAA TAC ATG GTC AAC GCA CAC ACC GCC GAC GCC | 631 |
| | Ile Ala Asp Ser Val Glu Tyr Met Val Asn Ala His Thr Ala Asp Ala | |
| | 380 385 390 | |
| | ATG GTG TGT ATC TCC AAC TGT GAC AAG ATC ACC CCA GGC ATG CTC AAC | 679 |
| 35 | Met Val Cys Ile Ser Asn Cys Asp Lys Ile Thr Pro Gly Met Leu Asn | |
| | 395 400 405 | |
| | GCA GCA ATG CGC CTG AAC ATC CCA GTG GTC TTC GTT TCC GGT GGC CCA | 727 |
| | Ala Ala Met Arg Leu Asn Ile Pro Val Val Phe Val Ser Gly Gly Pro | |
| | 410 415 420 425 | |
| 40 | ATG GAA GCT GGC AAG GCT GTC GTC GTT GAG CGC GTT GCA CAC GCA CCA | 775 |
| | Met Glu Ala Gly Lys Ala Val Val Val Glu Arg Val Ala His Ala Pro | |
| | 430 435 440 | |
| | ACC GAC CTC ATC ACC GCG ATC TCC GCA TCC GCA AGC GAT GCA GTC GAC | 823 |
| | Thr Asp Leu Ile Thr Ala Ile Ser Ala Ser Ala Ser Asp Ala Val Asp | |
| 45 | 445 450 455 | |
| | GAC GCA GGC CTT GCA GCC GTT GAA CGA TCC GCA TGC CCA ACC TGT GGC | 871 |
| | Asp Ala Gly Leu Ala Ala Val Glu Arg Ser Ala Cys Pro Thr Cys Gly | |
| | 460 465 470 | |
| | TCC TGC TCC GGT ATG TTC ACC GCG AAC TCC ATG AAC TGC CTC ACC GAA | 919 |
| 50 | Ser Cys Ser Gly Met Phe Thr Ala Asn Ser Met Asn Cys Leu Thr Glu | |
| | 475 480 485 | |
| | GCT CTG GGA CTT TCT CTC CCG GGC AAC GGC TCC ACT CTG GCA ACC CAC | 967 |

55

EP 1 006 189 A2

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| | Ala | Leu | Gly | Leu | Ser | Leu | Pro | Gly | Asn | Gly | Ser | Thr | Leu | Ala | Thr | His | |
| | 490 | | | | | 495 | | | | | 500 | | | | | 505 | |
| 5 | GCA | GCA | CGT | CGC | GCA | CTG | TTT | GAA | AAG | GCC | GGC | GAA | ACC | GTC | GTT | GAA | 1015 |
| | Ala | Ala | Arg | Arg | Ala | Leu | Phe | Glu | Lys | Ala | Gly | Glu | Thr | Val | Val | Glu | |
| | | | | | 510 | | | | | 515 | | | | | 520 | | |
| | CTG | TGC | CGC | CGC | TAC | TAC | GGT | GAA | GAA | GAC | GAA | TCC | GTT | CTG | CCA | CGT | 1063 |
| | Leu | Cys | Arg | Arg | Tyr | Tyr | Gly | Glu | Glu | Asp | Glu | Ser | Val | Leu | Pro | Arg | |
| | | | | | 525 | | | | | 530 | | | | | 535 | | |
| 10 | GGC | ATT | GCC | ACC | AAG | AAG | GCA | TTC | GAA | AAC | GCA | ATG | GCA | CTG | GAT | ATG | 1111 |
| | Gly | Ile | Ala | Thr | Lys | Lys | Ala | Phe | Glu | Asn | Ala | Met | Ala | Leu | Asp | Met | |
| | | | 540 | | | | | 545 | | | | | 550 | | | | |
| | GCC | ATG | GGT | GGA | TCC | ACC | AAC | ACC | ATC | CTC | CAC | ATC | CTC | GCA | GCT | GCC | 1159 |
| 15 | Ala | Met | Gly | Gly | Ser | Thr | Ala | Thr | Ile | Leu | His | Ile | Leu | Ala | Ala | Ala | |
| | | | 555 | | | | | 560 | | | | | 565 | | | | |
| | CAG | GAA | GGC | GAA | GTT | GAC | TTC | GAC | CTC | GCA | GAC | ATC | GAC | GAA | CTG | TCC | 1207 |
| | Gln | Glu | Gly | Glu | Val | Asp | Phe | Asp | Leu | Ala | Asp | Ile | Asp | Glu | Leu | Ser | |
| | | | | | | 575 | | | | | 580 | | | | | 585 | |
| 20 | AAA | AAC | GTC | CCC | TGC | CTG | TCC | AAG | GTT | GCA | CCA | AAC | TCC | GAC | TAC | CAC | 1255 |
| | Lys | Asn | Val | Pro | Cys | Leu | Ser | Lys | Val | Ala | Pro | Asn | Ser | Asp | Tyr | His | |
| | | | | | 590 | | | | | 595 | | | | | 600 | | |
| | ATG | GAA | GAC | GTC | CAC | CGC | GCC | GGT | CGC | ATT | CCA | GCA | CTG | CTC | GGC | GAG | 1303 |
| | Met | Glu | Asp | Val | His | Arg | Ala | Gly | Arg | Ile | Pro | Ala | Leu | Leu | Gly | Glu | |
| | | | | | 605 | | | | 610 | | | | | | 615 | | |
| 25 | CTC | AAC | CGC | GGT | GGC | CTG | CTG | AAC | AAG | GAC | GTC | CAC | TCC | GTT | CAC | TCC | 1351 |
| | Leu | Asn | Arg | Gly | Gly | Leu | Leu | Asn | Lys | Asp | Val | His | Ser | Val | His | Ser | |
| | | | | | 620 | | | | 625 | | | | | | 630 | | |
| | AAC | GAC | CTT | GAA | GGT | TGG | TTG | GAT | GAC | TGG | GAT | ATC | CGC | TCT | GGC | AAG | 1399 |
| 30 | Asn | Asp | Leu | Glu | Gly | Trp | Leu | Asp | Asp | Trp | Asp | Ile | Arg | Ser | Gly | Lys | |
| | | | | | 635 | | | | | 640 | | | | | | 645 | |
| | ACC | ACC | GAA | GTA | GCA | ACC | GAA | CTC | TTC | CAC | GCA | GCC | CCA | GGT | GGC | ATC | 1447 |
| | Thr | Thr | Glu | Val | Ala | Thr | Glu | Leu | Phe | His | Ala | Ala | Pro | Gly | Gly | Ile | |
| | | | | | | 655 | | | | | 660 | | | | | 665 | |
| 35 | CGC | ACC | ACC | GAA | GCA | TTC | TCC | ACC | GAG | AAC | CGC | TGG | GAC | GAA | CTC | GAC | 1495 |
| | Arg | Thr | Thr | Glu | Ala | Phe | Ser | Thr | Glu | Asn | Arg | Trp | Asp | Glu | Leu | Asp | |
| | | | | | 670 | | | | | 675 | | | | | 680 | | |
| | ACC | GAC | GCT | GCC | AAG | GGC | TGC | ATC | CGC | GAC | GTT | GAA | CAC | GCC | TAC | ACC | 1543 |
| | Thr | Asp | Ala | Ala | Lys | Gly | Cys | Ile | Arg | Asp | Val | Glu | His | Ala | Tyr | Thr | |
| | | | | | 685 | | | | | 690 | | | | | 695 | | |
| 40 | GCC | GAC | GGC | GGC | CTG | GTT | GTT | CTT | CGC | GGC | AAC | ATC | TCC | CCT | GAC | GGC | 1591 |
| | Ala | Asp | Gly | Gly | Leu | Val | Val | Leu | Arg | Gly | Asn | Ile | Ser | Pro | Asp | Gly | |
| | | | | | 700 | | | | 705 | | | | | | 710 | | |
| | GCA | GTG | ATC | AAG | TCC | GCA | GGT | ATC | GAA | GAA | GAG | CTG | TGG | AAC | TTC | ACC | 1639 |
| 45 | Ala | Val | Ile | Lys | Ser | Ala | Gly | Ile | Glu | Glu | Glu | Leu | Trp | Asn | Phe | Thr | |
| | | | | | 715 | | | | 720 | | | | | | 725 | | |
| | GGA | CCA | GCA | CGA | GTT | GTC | GAA | AGC | CAG | GAA | GAG | GCA | GTC | TCT | GTC | ATC | 1687 |
| | Gly | Pro | Ala | Arg | Val | Val | Glu | Ser | Gln | Glu | Glu | Ala | Val | Ser | Val | Ile | |
| | | | | | | 735 | | | | | 740 | | | | | 745 | |
| | CTG | ACC | AAG | ACC | ATC | CAA | GCT | GGC | GAA | GTT | CTG | GTC | GTC | CGC | TAC | GAA | 1735 |
| 50 | Leu | Thr | Lys | Thr | Ile | Gln | Ala | Gly | Glu | Val | Leu | Val | Val | Arg | Tyr | Glu | |
| | | | | | 750 | | | | | 755 | | | | | 760 | | |
| | GGC | CCA | TCA | GGT | GGA | CCA | GGC | ATG | CAG | GAA | ATG | CTT | CAC | CCA | ACC | GCA | 1783 |
| 55 | | | | | | | | | | | | | | | | | |

EP 1 006 189 A2

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|------------|------------|------------|------------|------------|-------------|-------|------|---------|------|--------|------|-----|-----|-----|-----|------|
| | Gly | Pro | Ser | Gly | Gly | Pro | Gly | Met | Gln | Glu | Met | Leu | His | Pro | Thr | Ala | |
| | | | | 765 | | | | | 770 | | | | | 775 | | | |
| 5 | TTC | CTC | AAG | GGA | TCC | GGC | CTG | GGC | AAG | AAG | TGT | GCA | CTG | ATC | ACC | GAC | 1831 |
| | Phe | Leu | Lys | Gly | Ser | Gly | Leu | Gly | Lys | Lys | Cys | Ala | Leu | Ile | Thr | Asp | |
| | | | 780 | | | | | 785 | | | | | 790 | | | | |
| | GGC | CGT | TTC | TCC | GGA | GGT | TCC | TCA | GGA | CTG | TCC | ATC | GGC | CAC | GTC | TCC | 1879 |
| | Gly | Arg | Phe | Ser | Gly | Gly | Ser | Ser | Gly | Leu | Ser | Ile | Gly | His | Val | Ser | |
| | | | 795 | | | | 800 | | | | | 805 | | | | | |
| 10 | CCA | GAA | GCA | GCA | CAC | GGC | GGA | GTC | ATT | GGT | CTG | ATC | GAA | AAC | GGC | GAC | 1927 |
| | Pro | Glu | Ala | Ala | His | Gly | Gly | Val | Ile | Gly | Leu | Ile | Glu | Asn | Gly | Asp | |
| | 810 | | | | | 815 | | | | | 820 | | | | | 825 | |
| | ATC | GTC | TCC | ATC | GAC | GTT | CAC | AAC | CGC | AAG | CTC | GAA | GTT | CAG | GTC | TCC | 1975 |
| | Ile | Val | Ser | Ile | Asp | Val | His | Asn | Arg | Lys | Leu | Glu | Val | Gln | Val | Ser | |
| 15 | | | | | 830 | | | | | 835 | | | | | 840 | | |
| | GAC | GAG | GAA | CTC | CAG | CGC | CGC | CGC | GAC | GCT | ATG | AAC | GCC | TCC | GAG | AAG | 2023 |
| | Asp | Glu | Glu | Leu | Gln | Arg | Arg | Arg | Asp | Ala | Met | Asn | Ala | Ser | Glu | Lys | |
| | | | | 845 | | | | | 850 | | | | | 855 | | | |
| 20 | CCA | TGG | CAG | CCA | GTC | AAC | CGT | AAC | CGC | GTT | GTC | ACC | AAG | GCA | CTG | CGC | 2071 |
| | Pro | Trp | Gln | Pro | Val | Asn | Arg | Asn | Arg | Val | Val | Thr | Lys | Ala | Leu | Arg | |
| | | | 860 | | | | | 865 | | | | | 870 | | | | |
| | GCA | TAC | GCA | AAG | ATG | GCT | ACC | TCC | GCT | GAT | AAG | GGT | GCA | GTC | CGT | CAG | 2119 |
| | Ala | Tyr | Ala | Lys | Met | Ala | Thr | Ser | Ala | Asp | Lys | Gly | Ala | Val | Arg | Gln | |
| | | 875 | | | | | 880 | | | | | 885 | | | | | |
| 25 | GTC | GAC | TAACCC | TTTG | TGAGT | GTTTG | AGCAC | CGGT | CCCTACT | TTTG | GGTTCC | GGTG | | | | | 2175 |
| | Val | Asp | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | | 890 | | | | | | | | | | | | | | |
| | CTTTTTCATG | TCTTGGCCTG | TGTGGGCGTG | GTGGAGCTCC | CCGTTGCAAA | TACTCACCAC | | | | | | | | | | | 2235 |
| 30 | AAGTTGCAGG | ATTTCTGCTG | GTTGTGGTGG | ATTTTCCCGC | TTTATAGCCC | TATGCGTGCA | | | | | | | | | | | 2295 |
| | ACTTTCGGAG | CGATTCCAAA | GGGCAAAGCC | CTGTTTGTGG | TGGATCCTTG | CCCTGGAAGC | | | | | | | | | | | 2355 |
| | TTTCAGGAAC | CACAACTACC | CCACTGACCC | CAAAGTGGAT | AGGCCCTATT | CTTCCGTTTA | | | | | | | | | | | 2415 |
| | AGCGCCTCAA | ACACCTCTCC | CCACACTTGA | CCCATTAGGC | AATTACGAAT | CCTTAAACAG | | | | | | | | | | | 2475 |
| 35 | CCTTCTACAG | CACCATGCCC | CAAACCGAAC | CCAGGCATGA | AAAAGACCCT | CACCAGGAGG | | | | | | | | | | | 2535 |
| | GTCTTTTCT | AAAACCTTTG | CTACGCGATT | GGGTTACAC | CCGCACCGAA | CCACCACAGC | | | | | | | | | | | 2595 |
| | AGAACTGCCG | CTGCGATGCC | GATGACCACG | AAGATCCACG | AGCTCACCAG | TGGACGCTTT | | | | | | | | | | | 2655 |
| 40 | GCCCAACCTC | GGCCAGAGTC | AAGGGAAATC | TTGCCGGGGC | CGGTGAAC | TGAGTCCGACA | | | | | | | | | | | 2715 |
| | ACCACGATAG | TGAGGATCAG | TGCCAGCATC | AATGGCTCAC | TAAGTTCACC | CCAACCACCT | | | | | | | | | | | 2775 |
| | TCATGAGTGT | TGACTTGGTG | AAGGGTGGTA | AAGGATGTCG | CCACCGTGGC | TACCGCTGCT | | | | | | | | | | | 2835 |
| 45 | GCCACTGGGG | TCATCAGACC | AAGGAGCAGG | AAGACACCAG | CCGCAAGTTC | AATAGATGGA | | | | | | | | | | | 2895 |
| | AGCAGGATCG | CGAGGATTTC | AGGCCACTGG | TAACCAGCGA | ACTCTGCCTC | GACTCTA | | | | | | | | | | | 2952 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- 50 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LAENGE: 612 Aminosaeuren
 (B) ART: Aminosaeure
 (D) TOPOLOGIE: linear

55

EP 1 006 189 A2

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 5 | Met | Ile | Pro | Leu | Arg | Ser | Lys | Val | Thr | Thr | Val | Gly | Arg | Asn | Ala | Ala | 1 | 5 | 10 | 15 |
| | Gly | Ala | Arg | Ala | Leu | Trp | Arg | Ala | Thr | Gly | Thr | Lys | Glu | Asn | Glu | Phe | 20 | 25 | 30 | |
| 10 | Gly | Lys | Pro | Ile | Val | Ala | Ile | Val | Asn | Ser | Tyr | Thr | Gln | Phe | Val | Pro | 35 | 40 | 45 | |
| | Gly | His | Val | His | Leu | Lys | Asn | Val | Gly | Asp | Ile | Val | Ala | Asp | Ala | Val | 50 | 55 | 60 | |
| 15 | Arg | Lys | Ala | Gly | Gly | Val | Pro | Lys | Glu | Phe | Asn | Thr | Ile | Val | Asp | Asp | 65 | 70 | 75 | 80 |
| | Gly | Ile | Ala | Met | Gly | His | Gly | Gly | Met | Leu | Tyr | Ser | Leu | Pro | Ser | Arg | 85 | 90 | 95 | |
| 20 | Glu | Ile | Ile | Ala | Asp | Ser | Val | Glu | Tyr | Met | Val | Asn | Ala | His | Thr | Ala | 100 | 105 | 110 | |
| | Asp | Ala | Met | Val | Cys | Ile | Ser | Asn | Cys | Asp | Lys | Ile | Thr | Pro | Gly | Met | 115 | 120 | 125 | |
| 25 | Leu | Asn | Ala | Ala | Met | Arg | Leu | Asn | Ile | Pro | Val | Val | Phe | Val | Ser | Gly | 130 | 135 | 140 | |
| | Gly | Pro | Met | Glu | Ala | Gly | Lys | Ala | Val | Val | Val | Glu | Arg | Val | Ala | His | 145 | 150 | 155 | 160 |
| 30 | Ala | Pro | Thr | Asp | Leu | Ile | Thr | Ala | Ile | Ser | Ala | Ser | Ala | Ser | Asp | Ala | 165 | 170 | 175 | |
| | Val | Asp | Asp | Ala | Gly | Leu | Ala | Ala | Val | Glu | Arg | Ser | Ala | Cys | Pro | Thr | 180 | 185 | 190 | |
| 35 | Cys | Gly | Ser | Cys | Ser | Gly | Met | Phe | Thr | Ala | Asn | Ser | Met | Asn | Cys | Leu | 195 | 200 | 205 | |
| | Thr | Glu | Ala | Leu | Gly | Leu | Ser | Leu | Pro | Gly | Asn | Gly | Ser | Thr | Leu | Ala | 210 | 215 | 220 | |
| 40 | Thr | His | Ala | Ala | Arg | Arg | Ala | Leu | Phe | Glu | Lys | Ala | Gly | Glu | Thr | Val | 225 | 230 | 235 | 240 |
| | Val | Glu | Leu | Cys | Arg | Arg | Tyr | Tyr | Gly | Glu | Glu | Asp | Glu | Ser | Val | Leu | 245 | 250 | 255 | |
| 45 | Pro | Arg | Gly | Ile | Ala | Thr | Lys | Lys | Ala | Phe | Glu | Asn | Ala | Met | Ala | Leu | 260 | 265 | 270 | |
| | Asp | Met | Ala | Met | Gly | Gly | Ser | Thr | Asn | Thr | Ile | Leu | His | Ile | Leu | Ala | 275 | 280 | 285 | |
| 50 | Ala | Ala | Gln | Glu | Gly | Glu | Val | Asp | Phe | Asp | Leu | Ala | Asp | Ile | Asp | Glu | 290 | 295 | 300 | |
| | Leu | Ser | Lys | Asn | Val | Pro | Cys | Leu | Ser | Lys | Val | Ala | Pro | Asn | Ser | Asp | 305 | 310 | 315 | 320 |
| 55 | Tyr | His | Met | Glu | Asp | Val | His | Arg | Ala | Gly | Arg | Ile | Pro | Ala | Leu | Leu | 325 | 330 | 335 | |
| | Gly | Glu | Leu | Asn | Arg | Gly | Gly | Leu | Leu | Asn | Lys | Asp | Val | His | Ser | Val | | | | |

| | 340 | 345 | 350 |
|----|--|-----|-----|
| 5 | His Ser Asn Asp Leu Glu Gly Trp Leu Asp Asp Trp Asp Ile Arg Ser 355 360 365 | | |
| | Gly Lys Thr Thr Glu Val Ala Thr Glu Leu Phe His Ala Ala Pro Gly 370 375 380 | | |
| 10 | Gly Ile Arg Thr Thr Glu Ala Phe Ser Thr Glu Asn Arg Trp Asp Glu 385 390 395 400 | | |
| | Leu Asp Thr Asp Ala Ala Lys Gly Cys Ile Arg Asp Val Glu His Ala 405 410 415 | | |
| 15 | Tyr Thr Ala Asp Gly Gly Leu Val Val Leu Arg Gly Asn Ile Ser Pro 420 425 430 | | |
| | Asp Gly Ala Val Ile Lys Ser Ala Gly Ile Glu Glu Glu Leu Trp Asn 435 440 445 | | |
| 20 | Phe Thr Gly Pro Ala Arg Val Val Glu Ser Gln Glu Glu Ala Val Ser 450 455 460 | | |
| | Val Ile Leu Thr Lys Thr Ile Gln Ala Gly Glu Val Leu Val Val Arg 465 470 475 480 | | |
| 25 | Tyr Glu Gly Pro Ser Gly Gly Pro Gly Met Gln Glu Met Leu His Pro 485 490 495 | | |
| | Thr Ala Phe Leu Lys Gly Ser Gly Leu Gly Lys Lys Cys Ala Leu Ile 500 505 510 | | |
| 30 | Thr Asp Gly Arg Phe Ser Gly Gly Ser Ser Gly Leu Ser Ile Gly His 515 520 525 | | |
| | Val Ser Pro Glu Ala Ala His Gly Gly Val Ile Gly Leu Ile Glu Asn 530 535 540 | | |
| 35 | Gly Asp Ile Val Ser Ile Asp Val His Asn Arg Lys Leu Glu Val Gln 545 550 555 560 | | |
| | Val Ser Asp Glu Glu Leu Gln Arg Arg Arg Asp Ala Met Asn Ala Ser 565 570 575 | | |
| 40 | Glu Lys Pro Trp Gln Pro Val Asn Arg Asn Arg Val Val Thr Lys Ala 580 585 590 | | |
| | Leu Arg Ala Tyr Ala Lys Met Ala Thr Ser Ala Asp Lys Gly Ala Val 595 600 605 | | |
| 45 | Arg Gln Val Asp 610 | | |

50

Abbildungen

[0050] Folgende Abbildungen sind beigefügt:

55

Abbildung 1:

Restriktionskartierung von pUR1 und Lage des sequenzierten Fragments.

Abbildung 2:
Restriktionskarte des Plasmids pEKEx2panBC.

Abbildung 3:
5 Restriktionskarte des Plasmids pECM3ilvBNCD.

Patentansprüche

1. In Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft Corynebacterium, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:
10
a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1,
b) codierend für das panC-Gen (Pantothensynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls
15 c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4.
2. Replizierbare DNA gemäß Anspruch 1 mit:
20 (i) den Nucleotidsequenzen, gezeigt in SEQ-ID-No.1, SEQ-ID-No.4,
(ii) mindestens einer dieser Sequenzen, die den jeweiligen Sequenzen (i) innerhalb des Bereichs der Degeneration des genetischen Codes entsprechen oder
25 (iii) mindestens einer dieser Sequenzen, die mit den zu jeweiligen Sequenzen (i) oder (ii) komplementären Sequenzen hybridisieren und gegebenenfalls.
(iiii) funktionsneutralen Sinnmutationen in i).
3. Mikroorganismen, insbesondere der Gattung Corynebacterium, transformiert durch die Einführung einer oder mehrerer der replizierbaren DNA gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2.
30
4. Pendelvektor (shuttle vector) pECM3ilvBNCD, **gekennzeichnet**
35 durch die in der Abb. 3 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als E.coli DH5 α mcr/pECM3ilvBNCD unter der Bezeichnung DSM 12457.
5. Pendelvektor (shuttle vector) pEKEx2panBC, **gekennzeichnet**
40 durch die in der Abb.2 wiedergegebene Restriktionskarte, hinterlegt als E.coli DH5 α mcr/pEKEx2panBC unter der Bezeichnung DSM 12456.
- 45 6. Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure, **dadurch gekennzeichnet**,
daß man in den Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium das panB- und panC-Gen und gegebenenfalls weitere für die entsprechenden Enzyme codierenden Nucleotidsequenzen verstärkt (überexprimiert) und
50 diese Mikroorganismen zur Fermentation einsetzt.
7. Verfahren zur Herstellung gemäß Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**,
55 daß man zusätzlich das ilvD-Gen verstärkt (überexprimiert).
8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7, **dadurch gekennzeichnet**,

daß man zusätzlich die Gene ilvBNCD verstärkt (überexprimiert).

9. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

5

daß man zur Erzielung der Verstärkung die Kopienzahl der Gene bzw. Nucleotidsequenzen in den Mikroorganismen durch Transformation mit diesen Gene bzw. Nucleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren erhöht.

10. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

10

daß man zur Erzielung der Verstärkung die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und Regulationsregion mutiert.

11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

15

daß man zur Erzielung der Verstärkung stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.

12. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 oder 7,
dadurch gekennzeichnet,

20

daß man zur Erzielung der Verstärkung die Lebensdauer der mRNA, die von den oben genannten Sequenzen als Matrize abgelesen wird, verlängert und/oder den Abbau der (des) entsprechenden Enzymproteins(e) verhindert.

25

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,

30

daß man die Gene gemäß Anspruch 1 in Corynebakterien überexprimiert, die weitere Metabolit- bzw. Antimetabolit-Resistenzmutationen aufweisen.

14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 12,
dadurch gekennzeichnet,

35

daß man zur Erzielung der Überexpression das Kulturmedium und/oder die Fermentationsführung ändert.

15. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 14,
dadurch gekennzeichnet,

40

daß man zumindest einen der Stoffwechselwege in den Mikroorganismen ausgeschaltet, die die Pantothenat-(Pantothensäure)-bildung verringern.

16. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 bis 15,
dadurch gekennzeichnet,

45

daß man Mikroorganismen einsetzt, in denen man zusätzlich zu einem oder mehreren der Gene die übrigen Gene des Stoffwechselweges der Pantothensäurebildung, einzeln oder gemeinsam, überexprimiert.

17. Verfahren gemäß Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,

50

daß man im Stoffwechselweg das ilvA-Gen ausschaltet.

18. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,

55

daß man Mikroorganismen der Gattung Corynebacterium einsetzt, die den Pendelvektor pECM3ilvBNCD ent-

halten.

19. Verfahren gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 6 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,

5

daß man Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* einsetzt, die den Pendelvektor pEKEx2panBC enthalten.

20. Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure durch Fermentation von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man

10

15

- a) zumindest eines der Gene panB oder panC, bevorzugt panBC, gegebenenfalls in Kombination mit dem *ilvD*-Gen, verstärkt (überexprimiert), und
- b) die Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen anreichert, und
- c) die Pantothensäure isoliert.

21. Verfahren gemäß den Ansprüchen 19 und 20,
dadurch gekennzeichnet,

20

daß man während der Fermentation eine Vorstufe der Pantothensäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe Aspartat, β -Alanin, Ketoisovalerat, Ketopantoat oder Pantoat.

25

30

35

40

45

50

55

Abbildung 1

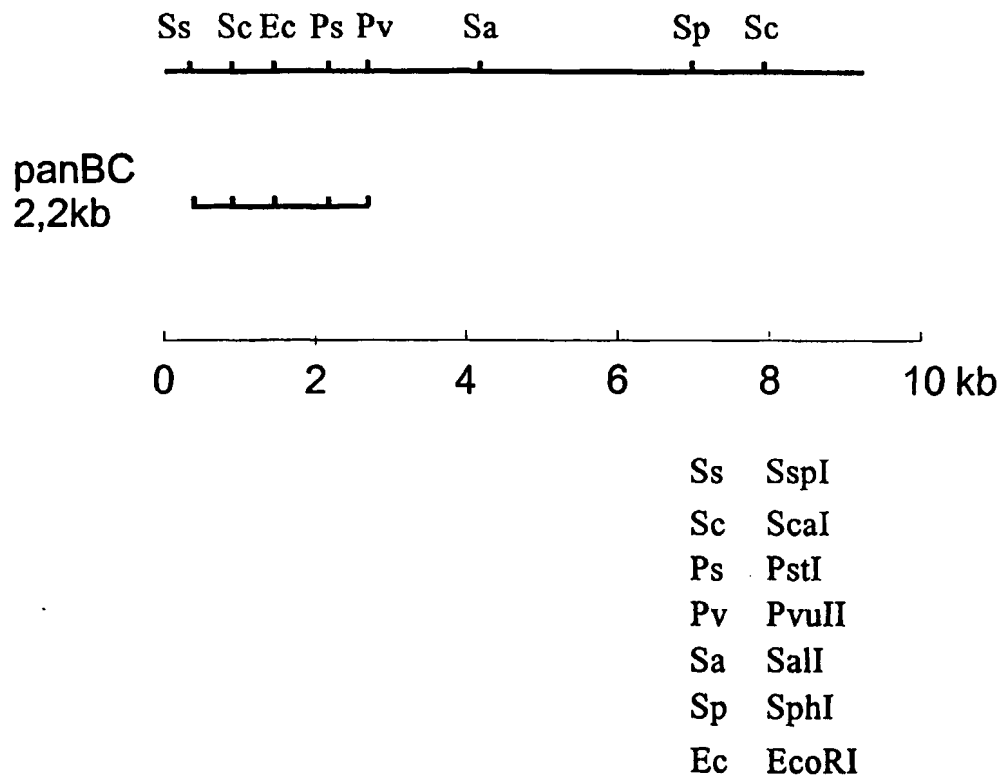


Abbildung 2

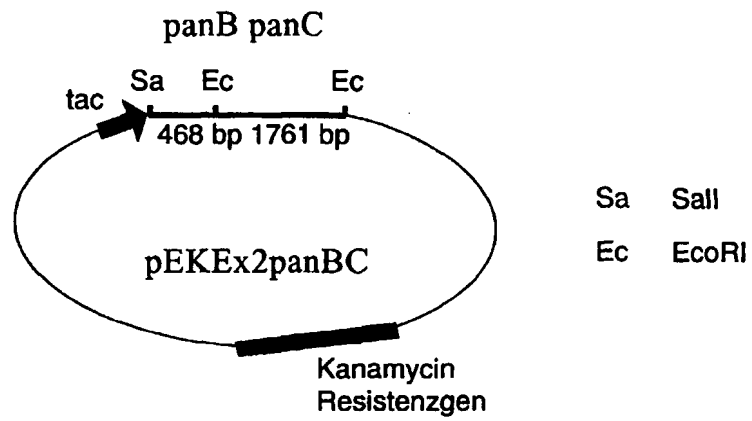
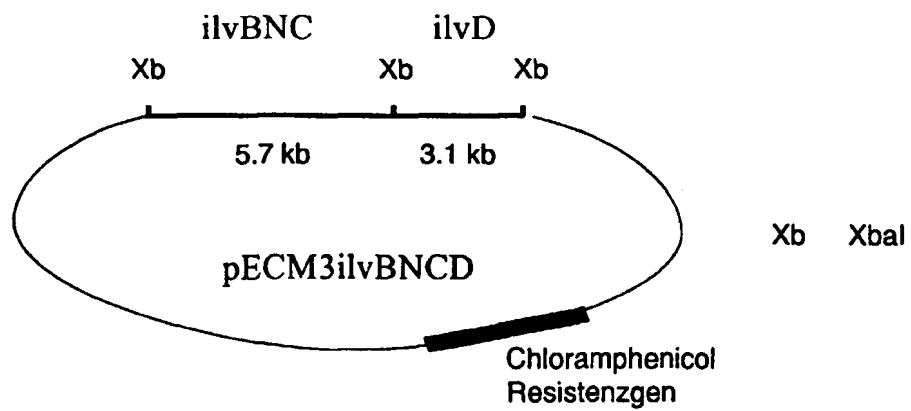


Abbildung 3



(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 006 189 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
17.09.2003 Patentblatt 2003/38

(43) Veröffentlichungstag A2:
07.06.2000 Patentblatt 2000/23

(21) Anmeldenummer: 99123738.9

(22) Anmeldetag: 30.11.1999

(51) Int Cl.7: **C12N 15/52**, C12N 15/54,
C12N 15/60, C12N 15/77,
C12P 13/02, C12N 9/00,
C12N 9/10, C12N 9/88,
C12R 1/15
// C12N1/21,(C12R1/15, 1:19)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 01.12.1998 DE 19855312

(71) Anmelder:
• Degussa AG
40474 Düsseldorf (DE)

• Forschungszentrum Jülich GmbH
52425 Jülich (DE)

(72) Erfinder:
• Eggeling, Lothar, Dr.
52428 Jülich (DE)
• Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)
• Sahm, Herrmann, Prof.Dr.
52428 Jülich (DE)

(54) **Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung coryneformer Bakterien**

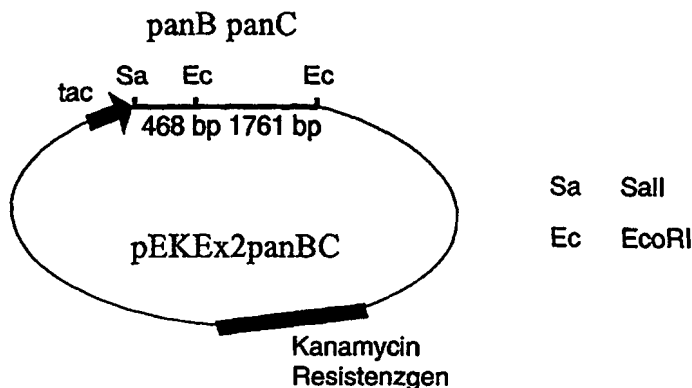
(57) Die Erfindung betrifft in Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium* replizierbare, gegebenenfalls rekombinante DNA mit der Herkunft *Corynebacterium*, die zumindest eine der folgenden Nucleotidsequenzen enthält, ausgewählt aus der Gruppe:

a) codierend für das panB-Gen (Ketopantoathydroxymethyltransferase), dargestellt in der SEQ-ID-No. 1,

b) codierend für das panC-Gen (Pantothensynthetase), dargestellt in der SEQ-ID-No.1, insbesondere das panBC-Operon und gegebenenfalls c) codierend für das ilvD-Gen (Dihydroxysäuredehydratase), dargestellt durch die SEQ-ID-No.4,

und ein Verfahren zur fermentativen Herstellung von D-Pantothensäure unter Verwendung von Mikroorganismen der Gattung *Corynebacterium*, in denen die genannten Gene verstärkt werden.

Abbildung 2



EP 1 006 189 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 12 3738

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | |
|---|---|--|---|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betrifft Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7) |
| X | EP 0 590 857 A (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES LTD) 6. April 1994 (1994-04-06) * Zusammenfassung; Ansprüche * * Seite 13, Zeile 53 - Seite 14, Zeile 9 * --- | 1-3,6, 9-16,20, 21 | C12N15/52 C12N15/54 C12N15/60 C12N15/77 C12P13/02 C12N9/00 C12N9/10 C12N9/88 C12R1/15 //C12N1/21, (C12R1/15, 1:19) |
| X | US 5 518 906 A (HIKICHI YUICHI ET AL) 21. Mai 1996 (1996-05-21) * Zusammenfassung; Ansprüche * * Spalte 8, Zeile 21 - Zeile 47 * * Spalte 14, Zeile 11 - Zeile 15 * --- | 1-3,6, 9-16,20, 21 | |
| P,X | SAHM HERMANN ET AL: "D-pantothenate synthesis in Corynebacterium glutamicum and use of panBC and genes encoding L-valine synthesis for D-pantothenate overproduction" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 65, Nr. 5, Mai 1999 (1999-05), Seiten 1973-1979, XP002138605 ISSN: 0099-2240 * das ganze Dokument * --- | 1-21 | |
| E | EP 1 006 192 A (DEGUSSA) 7. Juni 2000 (2000-06-07) SEQ ID N°3 * Seite 15 - Seite 18; Beispiel 2 * --- | 1-21 | |
| E | WO 01 00843 A (BASF AG) 4. Januar 2001 (2001-01-04) SEQ ID N°613, 615, 279, 281, 617 * Seite 1028 - Seite 1029; Anspruch 3 * * Seite 1030 - Seite 1031 * * Seite 565 - Seite 566 * * Seite 1032 - Seite 1034 * * Seite 567 - Seite 568 * --- | 1-5 | |
| -/-- | | | |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt | | | |
| Recherchenort MÜNCHEN | | Abschlußdatum der Recherche 29. Juli 2003 | Prüfer Pilat, D |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur | | T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentedokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | |

EPO FORM 1503 03.02 (P04C03)



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung
EP 99 12 3738

| EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE | | | |
|---|---|---|---|
| Kategorie | Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile | Betrifft Anspruch | KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7) |
| E | WO 00 50624 A (EGGELING LOTHAR ;SAHM HERMANN (DE); KERNFORSCHUNGSANLAGE JUELICH () 31. August 2000 (2000-08-31) * Seite 3, Zeile 1 - Zeile 9 * * Seite 9, Zeile 23 - Zeile 27 * * Ansprüche * ----- | 1-5 | |
| | | | RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int.Cl.7) |
| Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt | | | |
| Recherchenort MÜNCHEN | | Abschlußdatum der Recherche 29. Juli 2003 | Prüfer Pilat, D |
| KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument | | | |

EPO FORM 1503 (01.82) (P04C03)

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 12 3738

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentedokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

29-07-2003

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|---|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| EP 0590857 A | 06-04-1994 | CN 1095105 A ,B | 16-11-1994 |
| | | CN 1225394 A ,B | 11-08-1999 |
| | | CN 1225388 A | 11-08-1999 |
| | | CN 1225392 A | 11-08-1999 |
| | | CN 1225358 A ,B | 11-08-1999 |
| | | EP 0590857 A2 | 06-04-1994 |
| | | JP 6261772 A | 20-09-1994 |
| | | US 5518906 A | 21-05-1996 |
| US 5518906 A | 21-05-1996 | CN 1095105 A ,B | 16-11-1994 |
| | | CN 1225394 A ,B | 11-08-1999 |
| | | CN 1225388 A | 11-08-1999 |
| | | CN 1225392 A | 11-08-1999 |
| | | CN 1225358 A ,B | 11-08-1999 |
| | | EP 0590857 A2 | 06-04-1994 |
| | | JP 6261772 A | 20-09-1994 |
| EP 1006192 A | 07-06-2000 | DE 19855313 A1 | 08-06-2000 |
| | | BR 9905776 A | 24-04-2001 |
| | | CN 1256314 A | 14-06-2000 |
| | | EP 1006192 A2 | 07-06-2000 |
| | | HU 9904447 A2 | 28-11-2000 |
| | | JP 2000228990 A | 22-08-2000 |
| | | KR 2000047829 A | 25-07-2000 |
| | | SK 163399 A3 | 11-07-2000 |
| | | US 6184007 B1 | 06-02-2001 |
| | | ZA 9907406 A | 08-06-2000 |
| WO 0100843 A | 04-01-2001 | AU 5421300 A | 31-01-2001 |
| | | BR 0011806 A | 14-05-2002 |
| | | CA 2383865 A1 | 04-01-2001 |
| | | CN 1371417 T | 25-09-2002 |
| | | EP 1257649 A2 | 20-11-2002 |
| | | ES 2177475 T1 | 16-12-2002 |
| | | WO 0100843 A2 | 04-01-2001 |
| | | SK 18862001 A3 | 06-11-2002 |
| | | TR 200103707 T2 | 23-09-2002 |
| | | AU 5559000 A | 31-01-2001 |
| | | BR 0011805 A | 14-05-2002 |
| | | CA 2383875 A1 | 04-01-2001 |
| | | CN 1370235 T | 18-09-2002 |
| | | EP 1263963 A2 | 11-12-2002 |
| | | ES 2178979 T1 | 16-01-2003 |
| | | WO 0100844 A2 | 04-01-2001 |
| | | JP 2003517291 T | 27-05-2003 |
| | | SK 18872001 A3 | 03-12-2002 |

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82

**ANHANG ZUM EUROPÄISCHEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG NR.**

EP 99 12 3738

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten europäischen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

29-07-2003

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO 0100843 A | | TR 200103706 T2 | 21-10-2002 |
| | | US 2003049804 A1 | 13-03-2003 |
| | | AU 5836900 A | 31-01-2001 |
| | | BR 0011811 A | 18-06-2002 |
| | | CA 2380870 A1 | 04-01-2001 |
| | | EP 1290178 A2 | 12-03-2003 |
| | | ES 2184658 T1 | 16-04-2003 |
| | | HU 0203340 A2 | 28-01-2003 |
| | | WO 0100804 A2 | 04-01-2001 |
| | | SK 18882001 A3 | 10-09-2002 |
| | | TR 200103709 T2 | 21-08-2002 |
| | | AU 5421600 A | 31-01-2001 |
| | | BR 0011810 A | 07-05-2002 |
| | | CA 2380863 A1 | 04-01-2001 |
| | | CN 1370236 T | 18-09-2002 |
| | | EP 1255839 A2 | 13-11-2002 |
| | | ES 2177476 T1 | 16-12-2002 |
| | | WO 0100805 A2 | 04-01-2001 |
| | | SK 18912001 A3 | 08-10-2002 |
| | | TR 200103708 T2 | 21-08-2002 |
| | | AU 5420500 A | 31-01-2001 |
| | | BR 0011803 A | 09-04-2002 |
| | | CA 2380871 A1 | 04-01-2001 |
| | | CN 1370234 T | 18-09-2002 |
| | | EP 1254232 A2 | 06-11-2002 |
| | | ES 2176128 T1 | 01-12-2002 |
| | | HU 0203647 A2 | 28-01-2003 |
| | | WO 0100842 A2 | 04-01-2001 |
| | | SK 18902001 A3 | 10-09-2002 |
| | | TR 200103711 T2 | 22-07-2002 |
| WO 0050624 A | 31-08-2000 | DE 19907567 A1 | 24-08-2000 |
| | | AT 236991 T | 15-04-2003 |
| | | CZ 20013037 A3 | 16-01-2002 |
| | | DE 50001708 D1 | 15-05-2003 |
| | | WO 0050624 A1 | 31-08-2000 |
| | | EP 1155139 A1 | 21-11-2001 |
| | | JP 2002537771 A | 12-11-2002 |
| | | SK 12052001 A3 | 07-01-2002 |

EPO FORM P0481

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82